Juliana Goldbaum Crescente

Diferença de frequência dos anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCAs) na colangite esclerosante primária com ou sem doença inflamatória intestinal, nos subtipos de hepatite autoimune e na colangite biliar primária

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de mestre em
Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid
Cançado

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Crescente, Juliana Goldbaum

Diferença de frequência dos anticorpos anticitoplasma de neutrófilos
(ANCAs) na colangite esclerosante primária com ou sem doença inflamatória intestinal,
nos subtipos de hepatite autoimune e na colangite biliar primária / Juliana Goldbaum
Crescente. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Eduardo Luiz Rachid Cançado.

Descritores: 1.Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos 2.Colangite esclerosante
3.Hepatite autoimune 4.Doenças inflamatórias intestinais5.Ensaio de imunoadsorção
enzimática 6.Cirrose hepática biliar

USP/FM/DBD-402/16

Goldbaum Crescente, Juliana

Diferença de frequência dos anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCAs) na colangite esclerosante primária com ou sem doença inflamatória intestinal, nos subtipos de hepatite autoimune e na colangite biliar primária/ Juliana Goldbaum Crescente. – São Paulo, 2016.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento Gastroenterologia.

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado.

Descritores: 1. Anticorpo anticitoplasma de neutrófilo 2. Colangite esclerosante primária 3. Hepatite autoimune 4. Colangite biliar primária

USP/FM/DBD-402/16

Agradecimientos

Agradecimentos

À equipe que tornou este estudo possível:

Eduardo Cançado, meu orientador, obrigada por ter acreditado no meu trabalho e na paixão pelas doenças autoimunes. E tornou possível a realização deste estudo e apresentação em diversos congressos e simpósios;

Alessandra Delavance, co-autora desse estudo, responsável pela leitura conjunta das lâminas de ANCA e ANA, me ensinado muito sobre o trabalho com autoanticorpos;

Clarice, co-autora desse estudo, responsável juntamente com o Eduardo Cançado pela determinação dos autoanticorpos de todos os pacientes deste estudo. Além de ser uma amiga sempre presente e que sempre acreditou no meu potencial;

Márcio Diniz, co-autor, responsável pela análise estatística deste estudo e por ter dividido pacientemente seus conhecimentos conosco;

Luiz Eduardo, co-autor, responsável pela discussão de temas relevantes a este estudo;

Ao Grupo Fleury e ao Centro de estudos Agostinho Bettarelo pelo fomento que tornou este trabalho possível.

Aos demais colegas do Laboratório de doenças autoimunes e hepáticas e do Laboratório de Provas funcionais: Cris Nackhle, Thiago, Jaciane, Anibal e Monise;

Jandira, por me ajudar sempre que necessário;

Amigos que conheci no IMT, que tornaram o ambiente mais leve e sempre estiveram abertos para troca de conhecimento. Principalmente, Fernanda de Paula, Maiara, Gabriela, Mariane, Ariana, Beatriz, Dirce, Fátima, Fernanda Malta, Marcelo, Ricardo, Milena, Michele;

Amigas que estiveram presentes nestes anos e que mesmo sem ser da área da ciência opinaram, acreditaram em mim e neste trabalho. Proporcionaram momentos divertidos e zen, apesar do stress envolvido: Vanessa, Verônica, Katiane;

À CAPES, por me contemplar com a bolsa de mestrado da pós-graduação;

Ao apoio fundamental da família.

Essa dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1.	Introdução	1
1.1.	Colangite esclerosante primária	1
1.2.	Colite ulcerativa e doença de Crohn associadas à colangite esclerosante primária (CEP)	3
1.3	Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos	4
1.4	Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos, padrão perinuclear atípico em pacientes com hepatite autoimune (HAI)	8
1.5	Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos, padrão perinuclear atípico em pacientes com colangite biliar primária (CBP)	10
2.	Justificativa	12
3.	Objetivos	13
4.	Metodologia	14
4.1.	Local do estudo	14
4.2	Critérios de inclusão e de exclusão	14
4.3	Casuística	15
4.3.1	Pacientes com colangite esclerosante primária com e sem doença inflamatória intestinal associada	15
4.3.2	Pacientes com hepatite autoimune	16
4.3.3.	Pacientes com colangite biliar primária	16
4.3.4.	Previsão inicial de número mínimo de pacientes nos grupos de estudo	17
4.4.	Reação de imunofluorescência indireta para detectar anticorpos tissulares não órgãos-específicos	18

4.5	Pesquisa dos padrões do anticorpo anticitoplasma de neutrófilos por imunofluorescência indireta	19
4.5.1	Lâminas comerciais	19
4.5.2.	Preparação de lâminas com neutrófilos humanos <i>in house</i>	21
4.5.2.1.	Reação de imunofluorescência indireta em lâminas <i>in house</i>	22
4.6.	Pesquisa de padrões anticorpo antinúcleo (ANA, FAN)	22
4.7.	Reação imunoenzimática (ELISA)	23
4.8.	Aspectos éticos	23
4.9.	Análise estatística	24
5.	Resultados	25
5.1.	Gênero e idade dos pacientes com doenças autoimunes hepáticas e controles saudáveis	25
5.2.	Reatividade do ANCA por imunofluorescência indireta (IFI) quando pesquisado em lâminas fixadas com etanol	27
5.2.1.	Reatividade do p-ANCA clássico observado por IFI	27
5.2.2.	Reatividade do p-ANCA atípico observado por IFI	28
5.2.3.	Reatividade do c-ANCA clássico observado por IFI	30
5.2.4.	Reatividade do c-ANCA atípico observado por IFI	31
5.2.5.	Reatividade positiva em neutrófilos fixados em etanol, com padrão ANCA inconclusivo	32
5.3.	Resultados da reatividade do antiproteinase-3 e do antimieloperoxidase por ELISA	35
5.3.1.	Reatividade antiproteinase-3 (anti-PR3) por ELISA	35
5.3.2.	ELISA antimieloperoxidase (anti-MPO)	37
5.4.	Avaliação conjunta da reatividade do ANCA por imunofluorescência indireta e da reatividade dos ELISAs antimieloperoxidase e antiproteinase-3	40
5.4.1.	p-ANCA positivo por IFI e negativo por ELISA (IFI+/ELISA-)	40
5.4.2.	Reatividade do ANCA por imunofluorescência acrescida da positividade por ELISA do antimieloperoxidase e antiproteinase-3	42

5.5.	Anticorpos antinucleares (ANA)	44
5.6.	Comparação entre a reatividade do ANCA em neutrófilos fixados em etanol por imunofluorescência indireta e a do anti-MPO e anti-PR3 por ELISA	46
5.6.1.	Comparação entre a reatividade do p-ANCA clássico em neutrófilos fixados em etanol e a do ELISA anti-MPO	46
5.6.2.	Comparação entre reatividade do c-ANCA clássico em neutrófilos fixados em etanol e a do ELISA anti-PR3	47
5.6.3.	Comparação entre reatividade do p-ANCA atípico (por imunofluorescência indireta) em neutrófilos fixados em etanol e sem reatividade do antiproteinase-3 e/ou antimieloperoxidase (por ELISA)	49
5.7.	Avaliação dos anticorpos específicos contra neutrófilos fixados em etanol sem reatividade ao ELISA anti-PR3 e/ou anti-MPO	51
5.8.	Reatividade simultânea ao anti-PR3 e ao anti-MPO por ELISA	53
6.	Discussão	54
7.	Conclusões	69
8.	Referências bibliográficas	72

Lista de figuras

Figura 1	Padrão do ANCA em neutrófilos fixados com etanol	20
Figura 2	Reatividade do anti-PR3 por ELISA em densidade óptica de todos os pacientes do estudo	35
Figura 3	Reatividade do anti-MPO por ELISA em densidade óptica de todos os pacientes do estudo	37
Figura 4	Resultados dos valores de densidade óptica obtidos nas leituras de ELISA antiproteinase-3 e antimieloperoxidase simultaneamente	53

Lista de tabelas

Tabela 1	Mediana de idade dos portadores de doenças autoimunes hepáticas e dos controles saudáveis	26
Tabela 2	Reatividade do p-ANCA clássico por imunofluorescência indireta em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	28
Tabela 3	Reatividade do p-ANCA atípico por imunofluorescência indireta em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	30
Tabela 4	Reatividade do c-ANCA clássico por imunofluorescência indireta em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	31
Tabela 5	Amostras com padrões inconclusivos pela imunofluorescência indireta em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	32
Tabela 6	Reatividade de todos os padrões do ANCA por imunofluorescência indireta em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	34
Tabela 7	Detecção do anticorpo antiproteinase-3 por ELISA em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	36
Tabela 8	Detecção do anticorpo antimieloperoxidase por ELISA em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	38
Tabela 9	Detecção do anticorpo antimieloperoxidase por ELISA em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	40
Tabela 10	p-ANCA atípico positivo por imunofluorescência e com negatividade para ELISA antimieloperoxidase e ELISA antiproteinase-3 em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	41

Tabela 11	Positividade global do ANCA por imunofluorescência acrescida da positividade por ELISA antimieloperoxidase e antiproteinase-3 em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	43
Tabela 12	Principais padrões do anticorpo antinuclear presentes na colangite esclerosante primária	44
Tabela 13	Principais padrões do anticorpo antinuclear presentes na hepatite autoimune	45
Tabela 14	Principais padrões do anticorpo antinuclear presentes na colangite biliar primária e controles saudáveis	45
Tabela 15	Avaliação de concordância entre a reatividade ao anti-MPO por ELISA e o p-ANCA clássico observado por imunofluorescência indireta	45
Tabela 16	Avaliação de concordância do p-ANCA clássico por IFI pelo teste kappa	47
Tabela 17	Avaliação de concordância do c-ANCA clássico com a reatividade do antiproteinase 3 (anti-PR3)	48
Tabela 18	Avaliação de concordância do c-ANCA clássico pelo teste kappa.	48
Tabela 19	Positividade do antimieloperoxidase e antiproteinase-3 em amostras reativas para o c-ANCA clássico segundo a imunofluorescência indireta	49
Tabela 20	Resultados dos ELISAs antimieloperoxidase e antiproteinase-3 nas amostras positivas para o p-ANCA atípico em doenças autoimunes hepáticas em controles saudáveis	50
Tabela 21	Reatividade do p-ANCA atípico com a presença ou ausência de reatividade para o antimieloperoxidase e/ou antiproteinase 3	50
Tabela 22	Anticorpos específicos contra neutrófilos (NSA) por imunofluorescência e com negatividade para ELISA antimieloperoxidase e ELISA antiproteinase-3 nas diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis	52

Lista de abreviaturas

AMA	Anticorpo antimitocôndria
ANA	Anticorpo antinuclear ou fator antinuclear
ANCA	Anticorpo anticitoplasma de neutrófilos
Anti-MPO	Anticorpo antimieloperoxidase
Anti-PR3	Anticorpo antiproteinase 3
Anti-SLA/LP	Anticorpo antiantígeno hepático solúvel/fígado-pâncreas
Anti-LC1	Anticorpo anti citosol hepático tipo 1
Anti-LKM-1	Anticorpo antimicrosoma de fígado e rim tipo 1
Anti-2OADC	Anticorpo anti-complexo 2-oxoácido desidrogenase
ASMA	Anticorpo anti músculo liso
AUDC	Ácido ursodesoxicólico
BPI	Proteína de aumento da permeabilidade/bactericida
c-ANCA	Anticorpo anticitoplasma de neutrófilo padrão citoplasmático
CBP	Cirrose biliar primaria
CEP	Colangite esclerosante primaria
CEP/DII+	Colangite esclerosante primaria associada à doença inflamatória intestinal
CEP/DII-	Colangite esclerosante primaria não associada à doença inflamatória intestinal
DII	Doença inflamatória intestinal
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FAN	Fator antinúcleo, anticorpo antinúcleo
FITC	Isotiacionato de fluoresceína
Gene <i>ABCB4</i>	Gene responsável pela produção da proteína MDR3
HAI	Hepatite autoimune
HAI-1	Hepatite autoimune tipo 1
HAI-2	Hepatite autoimune tipo 2
HAI-3	Hepatite autoimune tipo 3

HLA	Antígeno leucocitário humano
ICAP	Consenso internacional em padrões ANA
IFI	Imunofluorescência indireta
LPAC	Colelitíase associada a baixos níveis de fosfolípide
MDR	Resistência a múltiplas drogas
NSA	Anticorpos específicos contra neutrófilos
p-ANCA	Anticorpo anticitoplasma de neutrófilo padrão perinuclear
p-ANCA atípico	Anticorpo anticitoplasma de neutrófilo padrão perinuclear atípico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PFIC3	Colestase intra-hepáticas familiar progressiva do tipo 3
Pkits	Preparação de Kits
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TBB5	Beta tubulina 5
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
VGT	Antimúsculo liso padrão tubular (vaso/glomérulo/túbulos)

Crescente JG. *Diferença de frequência dos anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) na colangite esclerosante primária com ou sem doença inflamatória intestinal, nos subtipos de hepatite autoimune e na colangite biliar primária* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Os anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) são classificados em três padrões observados na imunofluorescência indireta (IFI) utilizando neutrófilos humanos fixados em etanol e formaldeído como substrato. O c-ANCA apresenta forte associação com a enzima neutrofílica proteinase 3 (PR3), enquanto o p-ANCA está fortemente associado à mieloperoxidase (MPO). Na hepatite autoimune (HAI), colangite esclerosante primária (CEP) e doença inflamatória intestinal (DII) é observado outro padrão de IFI classificado como p-ANCA atípico que não apresenta reatividade contra as enzimas PR3 e MPO.

Objetivo: Determinação da frequência dos diferentes padrões de ANCAs na CEP com ou sem DII concomitante (CEP/DII⁺, CEP/DII⁻), em três subtipos de hepatite autoimune (HAI-1 com anticorpo antimúsculo liso padrão tubular; HAI-2 com anticorpo antimicrosoma de fígado e rim tipo 1; HAI antiantígeno hepático solúvel/fígado e pâncreas, na colangite biliar primária (CBP) e em controles saudáveis. O anticorpo antinúcleo poderia estar presente em todos os subtipos. Os resultados dos ANCAs foram comparados com os do ELISA para verificação de concordância entre os padrões e as reatividades antigênicas.

Metodologia: Foram estudados 249 pacientes (42 CEP/DII⁺; 33 CEP/DII⁻; 31 HAI-1; 30 HAI-2; 31 HAI-3; 52 CBP; 30 indivíduos saudáveis). As amostras de soro desses pacientes foram processadas pelos ensaios comerciais INOVA[®]: ANCA Etanol, Quanta Lite[™] MPO ELISA, Quanta Lite[™]PR3 ELISA, Quanta

Lite™ FAN HEp-2; e em lâminas com neutrófilos humanos fixados em etanol preparadas *in house*. Para as análises estatísticas foram utilizados os testes de Fisher com correção de Holm, os testes kappa e de McNemar.

Resultados: O p-ANCA esteve presente em 4 (1,6%), o c-ANCA em 3 (1,2%), o p-ANCA atípico em 62 (24,9%), o c-ANCA atípico em dois (0,8%) e o padrão inconclusivo em 14 (5,6%) de 249 amostras testadas. O p-ANCA atípico foi mais frequentemente detectado na CEP/DII⁺ (52,4%; IC 95% = 37,7-66,6) em relação à CEP/DII⁻ (21,2; IC 95% = 10,4-38,0), $p=0,005$. Não houve diferença significativa na frequência do p-ANCA atípico na CEP/DII⁻ em relação a CBP (15,38%, IC 95% = 7,83-27,89), $p=0,501$. O p-ANCA atípico foi significativamente mais positivo na HAI-1 (45,2%, IC 95% = 29,15-62,24, $p<0,001$) e HAI-3 (32,3%, IC = 18,46-49,97, $p=0,012$) em comparação a HAI-2 (3,3%, IC 95% = 0-18,09). Não foi detectada diferença entre a HAI-1 e a HAI-3 ($p=0,434$). Ao considerarmos todos os padrões conjuntamente, persistiram as mesmas diferenças significantes entre a CEP/DII⁺ versus CEP/ DII⁻ ($p=0,037$) e entre a HAI-2 versus HAI-1 ($p=0,011$) e versus HAI-3 ($p=0,024$). A reatividade do anti-PR3 foi encontrada em 25 das 249 amostras, sendo mais frequente na CEP/DII⁺ (31,0% IC 95%: 22,94 – 50,88) do que na CEP/ DII⁻ (12,1%, IC 95%: 4,52-29,46, $p = 0,025$). Anticorpos anti-MPO foram identificados em oito de 249 amostras (3,2%). Das 25 amostras positivas para o anti-PR3 apenas uma apresentou c-ANCA; outras duas amostras positivas para o c-ANCA foram negativas para o anti-PR3. As oito amostras positivas para o anti-MPO não apresentaram reatividade para o p-ANCA e as quatro que tinham esse padrão não foram reativas para o anti-MPO. Entre as 62 amostras reativas para o p-ANCA atípico 49 não apresentaram reatividade para o anti-PR3 e anti-MPO.

Das treze amostras positivas para o p-ANCA atípico e que exibiram reatividade ao ELISA, doze apresentaram positividade para o anti-PR3 e uma para o anti-MPO e para o anti-PR3.

Conclusões: 1) Do ponto de vista de reatividade dos ANCAs e do anti-PR3 a CEP/DII+ teve comportamento diferente da CEP/ DII⁻ que teve comportamento semelhante ao da CBP, o que pode sugerir que a maior frequência do p-ANCA atípico e do anti-PR3 esteja mais associada à DII do que à CEP; 2) Quanto à reatividade dos ANCAs, pacientes com HAI-1 e HAI-3 tiveram características semelhante entre si e diferente do da HAI-2; 3) Não houve concordância entre os resultados da IFI para os padrões c-ANCA e p-ANCA clássicos e os do ELISA anti-PR3 e anti-MPO; 4) A melhor concordância de leitura dos padrões do ANCA foi para o p-ANCA atípico, porque a maioria dos soros com esse padrão não teve reatividade nem para o anti-PR3 nem para o anti-MPO por ELISA; 5) Para doenças do aparelho digestivo (DII, CEP e HAI) é difícil relacionar os padrões do ANCA obtidos na imunofluorescência indireta com a reatividade observada nos ELISAs comerciais.

Crescente JG. *Difference of frequency on antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in primary sclerosing cholangitis with or without IBD, subtypes of autoimmune hepatitis and primary biliary cholangitis* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo"; 2016.

Introduction: Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) are classified into three different patterns observed by indirect immunofluorescence (IIF) using human neutrophils fixed in ethanol and formaldehyde as substrate. C-ANCA has a strong association with neutrophil proteinase 3 enzyme (PR3), while p-ANCA is strongly associated with myeloperoxidase (MPO). In autoimmune hepatitis (AIH), primary sclerosing cholangitis (PSC) and inflammatory bowel disease (IBD), another pattern by IIF is frequently found, and it is classified as atypical p-ANCA, that does not show reactivity against the PR3 and MPO enzymes.

Aims: To determine the frequency of different ANCA patterns in PSC with or without concomitant IBD (PSC/IBD+, PSC/IBD-), in three subtypes of autoimmune hepatitis (AIH-1 with anti-smooth muscle antibody; AIH-2 with anti-liver-kidney microsome antibodies type 1, AIH-3 anti-soluble liver antigen/liver-pancreas), in primary biliary cholangitis (PBC) and in healthy controls. The antinuclear antibody could be present in all subtypes. The results of the ANCA determination were compared with those of the ELISA to verify the concordance between patterns and antigenic reactivities.

Material and methods: This study was composed by 249 patients (42 PSC/IBD+; 33 PSC/IBD-; 31 AIH-1; 30 AIH-2; 31 AIH-3; 52 PBC; 30 healthy controls). All serum samples from these patients were tested by INOVA®

commercial kits: ANCA Ethanol, Quanta Lite [™] MPO ELISA, Quanta Lite [™] PR3 ELISA, Quanta Lite [™] FAN HEp-2; and on in house ethanol-fixed human neutrophils. The statistical analyzes were performed by Fisher's tests, with Holm correction when needed; kappa and McNemar tests.

Results: p-ANCA was detected in 4 (1.6%), c-ANCA in 3 (1.2%), atypical p-ANCA in 62 (24.9%), atypical c-ANCA in two (0.8%) and an inconclusive pattern in 14 (5.6%) out of 249 samples tested. Atypical p-ANCA was more frequently detected in PSC/IBD+ (52.4%; 95% CI = 37.7-66.6) than in PSC/IBD- (21.2; 95% CI = 10.4 -38.0), $p = 0.005$. There was no significant difference in the frequency of atypical p-ANCA in PSC/IBD- comparing to PBC (15.38%, 95% CI = 7.83-27.89), $p = 0.501$. The atypical p-ANCA was significantly more positive in AIH-1 (45.2%, 95% CI = 29.15-62.24, $p < 0.001$) and AIH-3 (32.3%, CI = 18.46 - 49.97, $p = 0.012$) than AIH-2 (3.3%, 95% CI = 0-18.09). No differences were detected between AIH-1 and AIH-3 ($p = 0.434$). When all the patterns were combined, the same significant differences persisted between PSC/IBD+ versus PSC/IBD- ($p = 0.037$) and between AIH-2 versus AIH-1 ($p = 0.011$) and versus AIH-3 ($p = 0.024$). Anti-PR3 antibodies were detected in 25 out of 249 samples, being more frequent in PSC/IBD+ (31.0% CI 95%: 22.94 - 50.88) than in PSC/IBD- (12.1%, 95% CI: 4.52-29.46, $p = 0.025$). Anti-MPO antibodies were identified in eight of 249 samples (3.2%). Among 25 positive samples for anti-PR3, only one was c-ANCA by IIF and the two other c-ANCA positive samples were anti-PR3 negative. None of the eight anti-MPO positive samples showed reactivity for p-ANCA, and other four that had this pattern did not show anti-MPO reactivity. Among the 62 reactive samples for atypical p-ANCA, 49 showed no reactivity for anti-PR3 or anti-MPO. The remaining thirteen showed

reactivity to one of the ELISAs, 12 were anti-PR3 positive and one was simultaneously anti-MPO and anti-PR3 positive.

Conclusions: 1) According to ANCA and anti-PR3 reactivity, PSC/IBD+ had a different behavior from that of PSC/IBD-, which had similar behavior to PBC, which may suggest that the higher frequency of atypical p-ANCA and anti-PR3 is more associated to IBD than to PSC; 2) Regarding to the reactivity of ANCAs, patients with AIH-1 and AIH-3 had similar features among themselves but different from those with AIH-2; 3) There was no agreement between the IIF results for classical c-ANCA and p-ANCA patterns and those of the anti-PR3 and anti-MPO ELISAs; 4) The best agreement of ANCA reading patterns was for atypical p-ANCA, because most sera with this pattern show no reactivity to either anti-PR3 or anti-MPO by ELISA; 5) For digestive tract diseases (IBD, PSC and AIH) it is difficult to relate ANCA immunofluorescent patterns with the reactivity observed in commercial ELISAs.

Introdução

INTRODUÇÃO

1.1. Colangite Esclerosante Primária

Colangite esclerosante primária (CEP) é doença crônica do fígado de origem incerta que atinge as vias biliares intra- e extra-hepáticas. Embora não haja consenso, há diversos mecanismos envolvidos em sua origem, entre eles infecções bacterianas ou virais, absorção de toxinas no cólon, isquemia de ductos biliares e aspectos ambientais como o fumo. Por outro lado, alterações imunológicas como mudança na população de linfócitos no tecido, alterações moleculares na resposta HLA de classe II no epitélio dos ductos biliares, níveis elevados de gamaglobulinas, menor número de células T circulantes e ativação do sistema complemento sugerem algum papel da autoimunidade na patogênese da doença.^{1,2,3}

Se bem que muitas vezes seja doença assintomática, frequentemente os pacientes referem fadiga, prurido, icterícia, dor abdominal, perda de peso e febre. Geralmente a CEP é detectada após a constatação de alterações em exames bioquímicos hepáticos e confirmada mediante exame colangiográfico complementar, em que são observadas estenoses e dilatações dos ductos biliares em diferentes locais, além de alterações radiológicas conhecidas como aspecto de “contas de rosário”. Do ponto de vista histológico observa-se fibrose concêntrica dos ductos biliares, conhecida como “lesão em casca de cebola”, em geral com pouco infiltrado inflamatório ao se comparar com as lesões floridas da colangite biliar primária (CBP).^{1,2,4}

A CEP é doença relativamente rara, que atinge de 10 a 40 pessoas por milhão. Há maior incidência em homens jovens do que em mulheres, numa proporção de 2:1. Cinquenta a 80% dos pacientes com CEP têm doença

inflamatória intestinal associada, principalmente a colite ulcerativa e menos frequentemente a doença de Crohn. Em alguns pacientes a doença inflamatória intestinal pode se manifestar antes do diagnóstico da CEP.¹ Da mesma forma, outras doenças também podem estar associadas a CEP, em especial doenças autoimunes, por exemplo tireoidite, artrite reumatoide, doença celíaca e hepatite autoimune (HAI).⁵

Não há consenso sobre como deve ser realizado o tratamento da CEP, já que a maioria das drogas utilizadas apresenta resultado insatisfatório, restando apenas o tratamento dos sintomas e das complicações devido à colestase e, em última instância, a realização do transplante de fígado para casos mais graves e avançados.^{2,6} De acordo com as “Diretrizes de Doenças Colestáticas e Hepatite Autoimune da Sociedade Brasileira de Hepatologia”⁷ recomenda-se o uso de até 22 mg/kg/dia de ácido ursodesoxicólico (AUDC) para se obter melhora clínica e bioquímica. Porém uso de AUDC é questionado pelo “ACG Clinical Guideline”⁸, por falta de estudos que mostrem evidências de melhora clínica em grandes coortes e pelo fato de que altas doses de AUDC possam aumentar os riscos de neoplasia colônica. Após o transplante, há 70 a 80% de chances de sobrevivência em 10 anos em alguns centros, enquanto a evolução natural da doença leva à cirrose e à falência hepática, resultando em morte após 12 anos de diagnóstico em média. Mesmo que o transplante seja bem sucedido, pode haver recorrência da CEP após o transplante de fígado em até 20% dos pacientes.^{2,9}

1.2. Colite Ulcerativa e doença de Crohn associadas a colangite esclerosante primária (CEP)

Sabe-se que a associação entre a colite ulcerativa e a CEP altera o comportamento dessas doenças. Por um lado, há estudos que sugerem maior gravidade da colite ulcerativa, com maior prevalência de pancolite, ausência de acometimento retal, ileíte de refluxo, além de os pacientes serem cinco vezes mais suscetíveis à displasia e câncer colorretal do que pacientes com apenas o comprometimento colônico após 20 a 25 anos de diagnóstico.¹⁰ Por outro lado, estudos, como o de Marelli *et al.*,¹¹ sugerem que linfócitos responsáveis pela inflamação hepática e colorretal, provavelmente pertenceriam à mesma população, diminuindo o grau de inflamação colorretal em pacientes que possuem essa associação em comparação aos que não têm CEP, sendo essa uma hipótese sustentada por outros estudos como o de Sano *et al.*¹² e Moayyeri *et al.*¹³

Segundo Miao *et al.*,¹⁴ até 2011, apenas 15 casos teriam sido relatados na literatura com a associação doença de Crohn e CEP, sendo o primeiro deles descrito por Atkinson & Carroll em 1964.¹⁵ Atualmente estima-se uma prevalência de 3,4% dos pacientes com CEP, em geral em pacientes com comprometimento colônico extenso. Entre esses casos há maior incidência em homens na proporção de 2:1, com idade média de 39 anos.¹⁰ Já a colite ulcerativa pode estar presente em até 80% dos pacientes com CEP.¹⁶ Em nossa experiência, a maioria absoluta dos pacientes com CEP apresenta concomitância com colite ulcerativa, sendo excepcional o diagnóstico de doença de Crohn. Nos poucos pacientes com doença de Crohn, o diagnóstico inicial foi de colite ulcerativa, com o diagnóstico sendo modificado posteriormente em virtude de detecção de alterações de doença de Crohn ao longo da evolução clínica.

Embora alguns dos sintomas das duas doenças, doença inflamatória intestinal e CEP, possam apresentar similaridades dificultando estabelecer exatamente quando foi realmente feito o diagnóstico inicial delas, o desenvolvimento da doença intestinal e CEP parece ser independente, pois sintomas característicos de colite ulcerativa podem ocorrer anos antes do aparecimento da CEP, assim como lesões no fígado podem se desenvolver mesmo após a remoção cirúrgica do cólon. Outra característica é a diminuição da idade média de 70 para 40 anos em relação ao desenvolvimento de colangiocarcinoma em pacientes com CEP que possuem risco para desenvolvimento dessa neoplasia de 6 a 23%.¹⁴

1.3. Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos

O ANCA associado a doenças intestinais inflamatórias foi inicialmente descrito por Faber e Elling em 1966,¹⁶ como anticorpo antinuclear específico para leucócitos. Posteriormente anticorpos semelhantes foram também identificados e relacionados com o diagnóstico de granulomatose com poliangeite e glomerulonefrite. A técnica mais difundida para essa análise é a de imunofluorescência indireta (IFI), porém trabalhos como o de Tervaert & Damoiseaux têm comparado sua eficiência em relação aos resultados obtidos por teste imunoenzimático (ELISA), que é capaz de detectar diferentes tipos de ANCA mediante a sua pesquisa contra antígenos específicos.¹⁸

O ANCA é classificado em três subtipos de acordo com o padrão em IFI mostrado em neutrófilos humanos fixados em etanol e formaldeído. O primeiro a ser descrito foi o c-ANCA associado à granulomatose com poliangeite. Esse padrão de fluorescência é resultante da reação dos anticorpos com antígenos em grânulos citoplasmáticos cujo antígeno alvo é a proteinase 3 (PR3).¹⁹

Vale ressaltar que a PR3 está presente apenas em seres humanos e primatas. Sua principal função, até então conhecida, está na sua atividade proteolítica. Ela é responsável pela degradação extracelular de proteínas em locais onde esteja ocorrendo processo inflamatório, assim como a elastase e a catepsina G, porém, se essa reação for prolongada ou excessiva, acarreta dano ao organismo.^{18,19,20}

Já o padrão p-ANCA é decorrente da reatividade contra várias enzimas, entre elas a catepsina, elastase, lactoferrina e catepsina G, proteína de aumento da permeabilidade/bactericida (BPI) e mieloperoxidase (MPO). Na angite necrosante o antígeno alvo é contra a MPO e, na verdade, o padrão p-ANCA nessa enfermidade é um artefato que ocorre durante o processamento do substrato, ao se fixar neutrófilos humanos com etanol. Isso se deve ao rearranjo dos grânulos citoplasmáticos com carga positiva que reagem com antígenos nucleares carregados negativamente, o que ocasiona areação perinuclear. Ao serem fixados com formalina, há alteração na distribuição das cargas iônicas proteicas com desaparecimento do padrão perinuclear que também se torna citoplasmático. Essa fixação destrói e altera antígenos responsáveis pela identificação do anticorpo antinúcleo abolindo essa reatividade o que facilita a caracterização do p-ANCA clássico.^{18,19}

Não se sabe ao certo o que induz a produção de anti-MPO, pois foi constatada apenas baixa associação entre o sistema HLA e a reatividade do ANCA. Porém, quanto à função, sabe-se que a mieloperoxidase é uma enzima presente dentro dos grânulos de neutrófilos capaz de catalisar a peroxidação do cloro transformando-o em hipoclorito, utilizado nos fagossomos para eliminar microrganismos fagocitados. Por outro lado, a MPO inativa inibidores de proteases

causando degradação de tecidos ao redor do neutrófilo. Embora relações entre MPO e infecções graves não tenham sido feitas, é interessante constatar que um a cada 2-4 mil indivíduos possuem deficiência dessa enzima.^{18,20}

O terceiro tipo de ANCA, primeiramente descrito por Wiik no começo da década de 1960, é caracterizado por padrão pontilhado fino ao redor do núcleo do neutrófilo, conhecido como p-ANCA atípico, pois geralmente não reage com a MPO ou com a PR3, além de não se tornar citoplasmático quando se realiza a reação com neutrófilos fixados em formalina.^{21,22,23} Esse padrão é o encontrado em pacientes com doenças inflamatórias intestinais, CEP e HAI e constitui o principal objetivo do estudo no trabalho proposto.

A taxa de detecção do p-ANCA atípico varia entre 26-94% dos pacientes com CEP, e em até 80%, quando a CEP está associada à colite ulcerativa e à doença de Crohn, o que sugere mecanismo comum de patogenicidade.²² Essa similaridade pode estar associada ao alvo do p-ANCA, embora tenham sido avaliadas diversas proteínas candidatas e nenhuma delas foi aceita de forma unânime. Entre elas cabe ressaltar alguns exemplos. Terjung *et al.*²⁴ constataram que a β tubulina 5 (TBB5), proteína filamentar associada à membrana nuclear de células, na presença da proteína bacteriana FtsZ em indivíduos geneticamente predispostos, seria o principal antígeno alvo do p-ANCA resultante de reação anormal a esse antígeno. Contudo, esses resultados necessitam de comprovação por outros estudos, assim como não se sabe como essa reação contra a β -tubulina 5 poderia estar envolvida na patogênese da doença.

Outros autores sugeriram a importância da elastase, catepsina G, lisosima, lactoferrina, proteína de aumento da permeabilidade/bactericida (BPI), entre outras por possuírem papel de defesa no organismo contra agentes infecciosos.¹⁸ Tervaert

& Demoiseaux por exemplo, acreditam que o alvo do ANCA na colite ulcerativa e CEP seja a lactoferrina.¹⁹ Assim o antígeno alvo do p-ANCA atípico ainda está mal caracterizado.

Dois trabalhos independentes realizados por Haagsma *et al.*²⁵ e Bansi *et al.*²⁶ constataram que mesmo após o transplante de fígado ou colectomia os títulos de p-ANCA não se alteraram na maioria dos casos. Salvo algumas exceções, observa-se redução dos títulos do p-ANCA logo após o transplante, provavelmente devido à ação de imunossupressores que podem mascarar temporariamente a redução dos títulos desses autoanticorpos. Acredita-se que a presença de p-ANCA após a cirurgia permaneça em decorrência das células B já estarem programadas para produzi-lo.

Terjung *et al.*²⁷ estudaram as diferenças entre o p-ANCA presente na doença inflamatória intestinal e na HAI por IFI e recomendaram a fixação em neutrófilos com formaldeído para diferenciar o p-ANCA clássico do p-ANCA atípico. Como os próprios autores constataram, estudos semelhantes são raros e necessitam-se mais esforços para a padronização da interpretação do padrão p-ANCA atípico.

Outra linha de investigação sugere que o p-ANCA atípico deveria ser visto como anticorpos específicos contra neutrófilos não ANCA, ou apenas chamados de anticorpos específicos contra neutrófilos (NSA). Os autores desse estudo mostraram que, embora não haja especificidade para essas células, essa reatividade talvez seja indício de processo inflamatório no organismo. Os mesmos autores constataram diferença na frequência de NSA na colite ulcerativa, 85-95%, em relação a CEP não associada à colite ulcerativa, 15-20%. Esse resultado surpreendente reforça a relevância do estudo proposto.²⁸

Recentemente, com melhor padronização das técnicas de ELISA para a pesquisa de anticorpos contra os antígenos-alvo PR3 e MPO, frequência elevado de anticorpos anti-PR3 foram descritos na doença inflamatória intestinal.^{21,22} Essa observação também foi confirmada pesquisando esses autoanticorpos por quimioluminescência.²⁹

1.4. p-ANCA atípico em pacientes na hepatite autoimune (HAI)

A HAI é também uma doença autoimune que atinge o fígado que acomete principalmente mulheres (na proporção de 4 mulheres para um homem). A faixa etária dos pacientes é ampla, mas em nosso meio atinge principalmente crianças, adolescentes e indivíduos jovens (menores de 25 anos). Os pacientes apresentam níveis elevados de aminotransferases e gamaglobulinas, principalmente de IgG. A biópsia hepática revela intensa atividade inflamatória com hepatite de interface exuberante, com moderada a intensa atividade, com presença de infiltrado inflamatório mononuclear, com importante componente plasmocitário e rosetas de hepatócitos. Embora os achados histológicos e a terapêutica sejam semelhantes nos pacientes com HAI, os autoanticorpos circulantes são marcadores importantes no diagnóstico e na classificação em diferentes subtipos.³⁰

A HAI tipo 1 (HAI-1) é caracterizada pela reatividade do anticorpo antinúcleo (ANA) e/ou do anticorpo antimúsculo liso (ASMA) presentes em 70 a 80% dos pacientes.³⁰ O ASMA caracteristicamente possui reatividade para diversas estruturas, notadamente de vasos, glomérulos e fibrilas intracelulares dos túbulos renais (VGT). A HAI tipo 2 (HAI-2) é caracterizada pela presença do antimicrosoma de fígado e rim tipo 1 (anti-LKM-1) e/ou do anticitosol hepático tipo 1 (anti-LC1). Geralmente acomete pacientes mais jovens e é responsável por formas mais

graves, como insuficiência hepática aguda grave e maior incidência de cirrose. A existência de um terceiro tipo de HAI, cujo marcador seria o anticorpo antiantígeno hepático solúvel/fígado-pâncreas (anti-SLA/LP), presente em 10 a 30% dos pacientes com HAI é questionável.³¹ Embora seja considerada em alguns centros marcador de formas graves da doença e de maior taxa de recidiva após a suspensão do tratamento, o anti-SLA/LP tem sido detectado nos dois tipos anteriores clássicos, principalmente no tipo 1.³⁶ Sua maior importância reside no fato de ser o marcador de cerca de um terço dos pacientes com HAI, que não apresentavam qualquer autoanticorpo mencionado anteriormente.

O diagnóstico da doença baseia-se em sistema de escore elaborado pelo grupo internacional de estudos da HAI. Isso se deve porque os sintomas clínicos gerais (fadiga, anorexia, astenia, perda de peso) são inespecíficos e os resultados dos exames bioquímicos superpõem-se aos de outras hepatites virais ou não virais.³³ Nesse sistema de escore a reatividade do p-ANCA é pontuado na ausência dos autoanticorpos clássicos (ASMA, ANA e anti-LKM-1).

Vale ressaltar que a reatividade para o p-ANCA está presente em 65-95% dos pacientes com HAI, porém seu alvo antigênico e ação não foram definidos até o momento.³³ Estima-se que a HAI sobreposta à doença inflamatória intestinal ocorra em 10-20% dos casos, enquanto a HAI sobreposta a CEP em 2-8% dos pacientes.³³

1.5. p-ANCA atípico em pacientes na colangite biliar primária (CBP)

A CBP é doença colestática autoimune que atinge o fígado de forma lenta e assintomática. Há maior incidência em mulheres (na proporção de 9:1) a partir da faixa da quinta década de vida, com prevalência de 1 em 100 com idade superior a 40 anos.^{34,35} É ainda 100 vezes mais prevalente em parentes de primeiro grau em relação à população geral, provavelmente por fatores genéticos ou ambientais. De forma geral sua incidência é baixa, resultando em apenas 0,6-2% das mortes por cirrose no mundo.³⁵

Diferentemente das doenças citadas anteriormente, CBP não é diagnosticada em crianças. O diagnóstico é feito pela constatação de alterações bioquímicas características resultantes de colestase (aumento de gamaglutamil transpeptidase e principalmente de fosfatase alcalina) e reatividade do anticorpo antimitocôndria (AMA). A realização da biópsia hepática não é necessária para o diagnóstico das formas clássicas, porém, quando realizada, revela lesões de ductos biliares muito peculiares (lesão biliar florida, com importante infiltrado inflamatório linfomononuclear agredindo o epitélio dos ductos biliares, muitas vezes com formação de folículos linfoides) e auxilia também no estadiamento da doença.³⁵ Está indicada em casos de suspeita diagnóstica de sobreposição com HAI.

Estudo de Roozendaal *et al.*³² buscou melhor entender o papel de p-ANCA em CBP e indicou que pacientes com títulos positivos de p-ANCA apresentavam baixos níveis de albumina, mas não indicava associação com cirrose.

Há controvérsias sobre a prevalência do p-ANCA em pacientes com CBP, variando de 2 - 15% dependendo do grupo de estudo selecionado.^{21,32} Entre os diversos motivos que podem justificar os diferentes resultados podem ser mencionados a forma de fixação dos neutrófilos, as diferentes técnicas utilizadas

para a realização da IFI e até na escolha do grupo controle.²¹ Por isso esforços para padronização do método, como o realizado por *International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA)*,³⁶ são de fundamental importância.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Como o diagnóstico de CEP é sem dúvida o mais difícil entre as doenças autoimunes hepáticas, pois se baseia na presença de doença biliar com alterações colangiográficas de estenose e dilatações que podem ser encontradas em outras situações,² a determinação de marcadores sorológicos fidedignos que auxiliem no seu diagnóstico é muito bem-vinda.

Nos pacientes sem doença inflamatória intestinal e naqueles com a forma de comprometimento de pequenos ductos biliares, a identificação das alterações histológicas típicas tem sido considerada de fundamental importância para se estabelecer o diagnóstico correto da doença hepática. A caracterização do p-ANCA atípico nessas situações ajudaria sobremaneira a confirmação do seu diagnóstico na ausência das características mais importantes.

Da mesma forma a alta frequência do p-ANCA atípico na HAI deve ser mais bem estudada em número significativo de pacientes com HAI-1, HAI-2, HAI com anticorpo anti-SLA/LP positivo, com a intenção de avaliar se há diferença na reatividade do p-ANCA de acordo com os subtipos de HAI, o que facilitaria a caracterização mais adequada dos diferentes tipos de HAI.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Determinar e comparar a frequência dos diversos padrões de ANCA (c-ANCA, p-ANCA e ANCA atípico), por imunofluorescência indireta, em pacientes com colangite esclerosante primária com ou sem doença inflamatória intestinal concomitante.

3.2. Determinar e comparar a frequência dos diversos padrões de ANCA (c-ANCA, p-ANCA e ANCA atípico) nos subtipos de hepatite autoimune, HAI-1 (antimúsculo liso padrão VGT/antiactina-F positivo sem reatividade para o anti-SLA/LP), HAI-2 (anti-LKM1 positivo) e HAI-3 (anti-SLA/LP positivo com ou sem fator antinúcleo associado, antimúsculo liso padrão VGT e anti-LKM1 negativos); CBP (antimitocôndria positivo);

3.3. Determinar e comparar a frequência dos anticorpos antiproteinase-3 e antimieloperoxidase na colangite esclerosante primária com ou sem doença inflamatória intestinal, nos três subtipos de hepatite autoimune e na colangite biliar primária.

3.4. Verificar a concordância dos diversos padrões do ANCA com a reatividade para os antígenos mieloperoxidase (MPO) e proteinase 3 (PR3) nos grupos citados anteriormente.

Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1. Local do estudo

Os pacientes foram selecionados do ambulatório do serviço de Gastrenterologia (2MG) grupo de fígado (2MG403 e 2MG430) do Hospital das Clínicas da FMUSP. As amostras de soro foram encaminhadas para o Instituto de Medicina Tropical/LIM 06 da USP para a realização dos experimentos. A produção de lâminas *in house* e leituras de lâminas comerciais e *in house* foram realizadas no LIM 06 e no Departamento de Imunologia e de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Fleury.

4.2. Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram admitidos indivíduos com diagnóstico previamente definido de CEP, HAI e CBP. Foram utilizadas amostras iniciais de soro ou dos episódios de recidiva (no caso da hepatite autoimune), evitando o uso de amostras após longos episódios de uso de corticoide e imunossupressores para os pacientes com HAI. Em relação aos pacientes com CEP com doença inflamatória intestinal, essa exigência nem sempre foi conseguida em razão dos pacientes frequentemente chegarem ao hepatologista em esquema de imunossupressão pela doença intestinal.

4.3. Casuística

4.3.1. Pacientes com CEP/DII+ e com CEP/DII-

O diagnóstico da CEP sempre foi estabelecido por meio de exames de imagem (colangiografia endoscópica retrógrada ou por ressonância magnética) ou pela presença de fibrose ductal concêntrica (CEP de pequenos ductos) naqueles pacientes com exames de imagem sem exibir as alterações de estenose/dilatações. O diagnóstico de DII foi estabelecido mediante o exame colonoscópico com alterações macroscópicas compatíveis com colite ulcerativa (macroscopicamente pela presença de ulcerações rasas, contíguas, ao longo dos diversos segmentos do cólon com infiltrado inflamatório composto por polimorfonucleares, com formação de microabscessos de criptas nos casos de colite ulcerativa). O diagnóstico de doença de Crohn foi dado pelo conjunto de alterações encontradas na colonoscopia, trânsito intestinal, tomografia de abdome e/ou ressonância magnética (evidências de estenose e/ou fístulas, com comprometimento transmural de segmentos colônicos ou do intestino delgado; presença de úlceras aftoides, serpiginosas, profundas à colonoscopia, presença de fístulas enterocutânea, enteroentérica, etc) com ou sem achado histológico de granulomas.

Nos pacientes com CEP/DII-, sempre foi realizada a colonoscopia para afastar a presença de DII e na maioria das vezes com comprovação histológica de ausência de comprometimento macroscópico visível. Foram excluídos pacientes com diagnóstico histológico e/ou colangiográfico de CEP que apresentavam manifestações sugestivas da variante genética de deficiência da proteína MDR3, a síndrome colelitíase associada abaxios níveis de fosfolípidos

(LPAC) secundária a mutações do gene *ABCB4* (colestase intrahepática familiar progressiva do tipo 3 – PFIC3). Dessa forma mesmo que houvesse o diagnóstico de CEP, a presença de história clínica de colelitíase em indivíduos ou familiares abaixo de 40 anos, a caracterização de litíase intra-hepática, a demonstração dos cálculos serem de colesterol e a história familiar ou da paciente de colestase induzida pela gravidez ou por estrógenos fizeram com que esses pacientes fossem excluídos do grupo de estudo.⁷ Outra situação clínica excluída sistematicamente foi a biliopatia portal, já que se trata de colangite esclerosante secundária.⁷

4.3.2. Pacientes com hepatite autoimune

Para o diagnóstico de HAI seguiram-se as recomendações do Grupo Internacional de HAI,⁷ sendo incluídos apenas pacientes com diagnóstico definitivo. Foram considerados pacientes com HAI-1 apenas aqueles com reatividade para o ASMA padrão VGT/antiactina-F com ou sem reatividade para o ANA. Para os pacientes com HAI-2, foram selecionados apenas os com reatividade para o anti-LKM1 com ou sem reatividade para o anti-LC1 ou ANA. Para analisar os pacientes com anti-SLA/LP foi exigida a ausência de reatividade para o ASMA padrão VGT/antiactina-F e anti-LKM1, mas poderia ocorrer reatividade para o ANA.

4.3.3. Pacientes com colangite biliar primária

Todos os pacientes apresentavam colestase bioquímica ou histológica com ou sem manifestações clínicas de prurido e exibiam simultaneamente

positividade para o AMA por IFI ou para enzimas do complexo enzimático 2-oxoácido desidrogenase pelo ELISA ou pelo immunoblotting.⁷

4.3.4. Previsão inicial de número mínimo de pacientes nos grupos de estudo

Os grupos de estudos foram definidos da seguinte forma:

1. CEP não associada à doença inflamatória intestinal (pelo menos 30 pacientes);
2. CEP associada à doença inflamatória intestinal (colite ulcerativa ou doença de Crohn) diagnosticada previamente por colonoscopia e/ou por outros exames de imagem do abdômen – tomografia computadorizada de abdome ou trânsito intestinal (pelo menos 30 pacientes);

O cálculo do tamanho amostral considerou a frequência de p-ANCA atípico na CEP com doença inflamatória intestinal (CEP/DII⁺) de 70% e na CEP sem doença inflamatória intestinal (CEP/DII⁻) concomitante de 20%, com erro alfa de 5% e um poder de 95% (1 – erro α);

3. Pelo menos 30 pacientes com HAI-1 que apresentassem anticorpos ASMA padrão VGT/antiactina-F positivos e negatividade para o anti-SLA/LP, 30 pacientes com HAI-2 com reatividade para o anti-LKM-1 sem reatividade para o anti-SLA/LP; 30 pacientes com HAI-3 anti-SLA/LP positivo sem anticorpos ASMA padrão ASMA VGT/antiactina-F e sem anti-LKM-1.

O cálculo do tamanho amostral considerou a frequência do p-ANCA atípico na HAI-1 de 80%, de 30% na HAI-3 (não há dados na literatura sobre a reatividade do ANCA nesse subgrupo de HAI) e de 30% na HAI-2 com erro alfa

de 5% e poder de 95% (1- erro α).

4. CBP (52 pacientes), todos pacientes com reatividade para o AMA;
5. Grupo controle com indivíduos saudáveis (30 pacientes), sem sintomas clínicos de qualquer enfermidade aparente.

4.4. Reação de imunofluorescência indireta (IFI) com o objetivo de detectar anticorpos tissulares não órgãos-específicos

A pesquisa do ASMA, anti-LKM-1 e AMA foi realizada de acordo com diretrizes internacionais em cortes não fixados de 4 μ de espessura, de estômago, fígado e rim de rata.³⁸ Os soros foram diluídos para triagem em PBS/Tween 20 nas diluições 1:40 e 1:80. Os soros positivos foram titulados até a diluição 1:320.

Para positividade do ASMA foi exigida reatividade em vasos, glomérulos e fibrilas intracelulares de células tubulares renais (ASMA padrão VGT/actina F) ou reatividade em microfilamentos em cultura de fibroblastos.³² Para definir positividade do anti-LKM1 foi exigida a reatividade em túbulos renais proximais e em hepatócitos difusamente e para o AMA reatividade em túbulos renais proximais e distais acompanhada também de padrão fluorescente em células parietais da mucosa gástrica.³² A pesquisa do anticorpo anti-complexo 2-oxoácido desidrogenase (anti-2OADC) foi realizada por meio do ensaio comercial ORG 516 AMA-M2 (ORGENTEC®).

4.5. Pesquisa dos padrões ANCA por imunofluorescência indireta

4.5.1. Lâminas comerciais

A reação de IFI foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante dos seguintes ensaios comerciais ANCA Etanol e ANCA formalina (*Inova Diagnostics*, San Diego, USA). Em seguida, foi feita a leitura das reações em microscópio de imunofluorescência, quando foram identificados os padrões de ANCA com base em características predefinidas de acordo com *International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA)*.³⁶ O padrão c-ANCA foi considerado na presença de fluorescência citoplasmática granular com frequente acentuação da intensidade da reação ao redor dos lobos nucleares. O padrão p-ANCA foi assim denominado na presença de reação homogênea dos lobos nucleares com frequente acentuação dos lóbulos nucleares. O p-ANCA atípico foi caracterizado como padrão fluorescente simultâneo citoplasmático e perinuclear, enquanto o c-ANCA atípico não apresentava acentuação da reação central ou interlobular. As amostras positivas que apresentavam fluorescência diferente da negativa e, por interferência do anticorpo antinúcleo (ANA), não foi possível relacionar a nenhuma das outras categorias definidas como ANCA, foram classificadas como padrão inconclusivo. Todos os casos inconclusivos ou duvidosos vistos nos ensaios comerciais foram repetidos com neutrófilos provenientes do setor de Preparação de Kits (PKits) do Grupo Fleury (*in house*) para comparação com os padrões já estabelecidos pelos profissionais que trabalham nesse laboratório. Esses padrões estão caracterizados na figura 1

Figura 1: Padrões de ANCAs em neutrófilos fixados com etanol; A) p-ANCA; B) c-ANCA; C) p-ANCA atípico; D) c-ANCA atípico.

O ensaio comercial ANCA Etanol possui para o c-ANCA clássico sensibilidade relativa de 90,9% e especificidade relativa de 98,8%, com concordância de 95,4%; enquanto para o p-ANCA clássico possui uma sensibilidade relativa de 61,0% e especificidade relativa de 100%, com concordância de 80,3%.

4.5.2. Preparação de lâminas com neutrófilos humanos *in house*

Os neutrófilos foram isolados a partir de aproximadamente 20 mL de sangue de indivíduos sadios colhidos em heparina sódica e adicionados ao mesmo volume de Metilcelulose-Hypaque (Sigma, Chem. Co., EUA). Após a sedimentação das hemácias, o plasma colhido foi submetido à centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi lavado com PBS por centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente e as hemácias residuais foram lisadas com água destilada gelada sob agitação por 2 minutos. O sedimento leucocitário foi então lavado novamente com PBS por 10 minutos a 2.000 rpm, e em seguida com PBS contendo 10% de soro fetal bovino (PBS/SFB, Cultilab, Brasil). O botão celular obtido foi ressuspenso em 2 mL de PBS/SFB. Os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer e a concentração acertada para aproximadamente 5×10^5 células/mL. As lâminas para imunofluorescência indireta foram preparadas por citocentrifugação a 500 rpm por 3 min. Após secagem à temperatura ambiente as lâminas foram fixadas em etanol P.A. (Merck AS, Brasil) por 5 minutos e armazenadas em freezer a -70°C até o momento do uso.

4.5.2.1. Reação de imunofluorescência indireta em lâminas *in house*

Para tanto, os soros dos pacientes foram diluídos a 1:20 em PBS-azida contendo 0,2% de Tween 80 e foram aplicados sobre as lâminas e incubados por 30 minutos à 37°C. Após esse período, as lâminas foram lavadas com PBS por 10 minutos e, então, incubadas sob as mesmas condições com fração de imunoglobulina total de soro de cabra antigamaglobulina humana conjugada ao isotiacionato de fluoresceína (FITC - Sigma Chem. Co., EUA). Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas e montadas com glicerina tamponada (70% em PBS). As leituras foram realizadas em microscópio de fluorescência com epi-iluminação Axiophot-Zeiss.

4.6. Pesquisa de padrões anticorpo antinúcleo (ANA, FAN)

Todos os soros também foram avaliados quanto a presença do fator antinúcleo (ANA, FAN) para esclarecer interferências com os padrões de ANCA utilizando o kit comercial Quanta Lite™ FAN HEp-2 Inova®, foram consideradas amostras positivas a partir do título de 1:40, conforme recomendações do fabricante.

Para a interpretação dos resultados, foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentassem padrão de fluorescência específica maior do que aquela considerada negativa, de acordo com o controle fornecido pelo kit comercial. Os padrões de interpretação foram definidos de acordo com o Consenso internacional de determinação da nomenclatura dos padrões do anticorpo antinúcleo HEp-2 Cell (ICAP) 2014-2015.³⁸

4.7. Reações imunoenzimáticas (ELISA)

Todas as amostras foram testadas pelo método de ELISA indireto a fim de definir a especificidade antigênica dos ANCAs. Foram utilizados os ensaios comerciais Quanta Lite™ MPO ELISA e Quanta Lite™ PR3 ELISA (Inova Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA) e seguiram-se as recomendações do fabricante. Mesmo soros negativos para o ANCA pela IFI foram analisados por ELISA uma vez que poderia ser detectada (ou não) a reação por essa técnica a despeito da reação ser negativa (ou positiva) pela IFI. Os soros negativos pela IFI e que apresentaram reatividade ao ELISA (anti-PR3 ou anti-MPO) foram considerados ser apenas positivos para essas especificidades antigênicas.

Os resultados das densidades ópticas (DOs) observadas tanto para o anti-MPO quanto para o anti-PR3 foram consideradas negativas ≤ 20 unidades (*cut-off*), positivas a partir de 21 unidades. Soros na faixa de 20-21 unidades também foram considerados negativos.

Para diagnóstico de pacientes com angíte necrosante O ensaio comercial Quanta Lite™ MPO ELISA possui uma sensibilidade relativa de 95,6%, especificidade relativa de 99%, valor preditivo positivo de 95,6% e valor preditivo negativo de 99%. Já para diagnóstico de pacientes com granulomatose com poliangíte, o ensaio comercial Quanta Lite™ PR3 ELISA possui uma sensibilidade relativa de 100%, especificidade relativa de 98,6% valor preditivo positivo de 93,5% e valor preditivo negativo de 100%.

4.8. Aspectos éticos

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela comissão ético-científica do Departamento de Gastroenterologia, pela Comissão de ética para Análise de

Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP, pelo Comitê de ética em pesquisa do Fleury e registrado na Plataforma Brasil.

4.9. Análise estatística

Os resultados foram descritos por meio de média $\pm$ desvio padrão para as variáveis quantitativas e frequência (porcentagem) para as variáveis qualitativas.

As estimativas de prevalência foram acompanhadas pelos seus respectivos intervalos de confiança 95% e comparadas entre os grupos pelo teste exato de Fisher, com correção de Holm quando necessário.^{39,40} A concordância dos métodos foi analisada pelo teste de McNemar e kappa.⁴¹ O teste kappa mede a concordância entre os resultados positivos e negativos simultaneamente pelas duas técnicas. Se o valor p for menor que 5% isso significa que houve concordância. Por outro lado, o teste de McNemar avalia discordância. Se o valor p for menor que 5% isso significa que houve discordância.

Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de p menores do que 5%. Todos os cálculos foram realizados do programa R, versão 3.1.2.⁴²

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Gênero e idade dos pacientes com doenças autoimunes hepáticas e controles saudáveis

A Tabela 1 mostra distribuição da idade nas diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis. A mediana de idade dos pacientes com CBP foi estatisticamente mais alta em comparação aos pacientes com CEP ($p < 0,001$).

Em relação à HAI, os pacientes mais jovens são os de HAI-2, seguidos dos portadores de HAI-1. Os portadores de HAI-3 foram os que apresentaram maior idade. Em relação aos tipos de HAI, o teste não paramétrico de Tukey apontou diferença estatisticamente significativa entre a HAI-3 versus a HAI-2 ($p < 0,005$). O mesmo teste não mostrou diferença estatisticamente significativa entre HAI-1 versus HAI-2 ($p=0,157$) e entre HAI-3 versus HAI-1 ($p=0,155$).

Tabela 1. Mediana de idade dos portadores de doenças autoimunes hepáticas e dos controles saudáveis

Grupo	Mediana idade (Mínima – máxima)
Colangite biliar primária (52)	51,0 (19,77 – 68,65)
Colangite esclerosante primária (75)	34,5 (4,77 – 67,03)
CEP/DII+ (42)	34,6 (4,77 – 62,81)
CEP/DII– (33)	31,3 (10,65 – 67,03)
Hepatite autoimune (92)	27,48 (2,64 – 78,63)
Hepatite autoimune tipo1 (31)	25,8 (6,25 – 65,96)
Hepatite autoimune tipo2 (30)	21,2 (6,72 – 42,77)
Hepatite autoimune tipo 3 (31)	37,2 (12,78 – 78,63)

CEP/DII+: Colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII–: Colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

O gênero masculino foi mais frequente na CEP. O teste de Fisher mostrou diferença significativa quanto ao gênero entre CEP/DII+ (29 homens em 42 pacientes, 69,0%) e CEP/DII– (14 homens em 33 pacientes, 42,4%, $p=0,034$). Para os mesmos grupos o teste T não apontou diferença significativa quanto a idade, $p=0,853$.

O gênero feminino foi mais comum nos pacientes com CBP e pacientes com CEP/DII– e foi significativamente mais prevalente nos pacientes com CBP (45 em 52 pacientes, 86,5%), do que nos pacientes com CEP/DII– ($p=0,004$).

O gênero feminino também foi mais frequentemente observado em todos os tipos de HAI: na HAI-1 foi 74,2% (23 em 31 pacientes), na HAI-2 foi 86,7% (26 em 30 pacientes), e na HAI-3 foi 100% (31 pacientes), $p=0,005$. O teste de

comparações múltiplas não apontou diferença significativa entre HAI-2 versus HAI-1, $p=0,335$ e HAI-3 versus HAI-2, $p=0,106$. Houve diferença estatisticamente significativa entre HAI-3 versus HAI-1, $p=0,015$.

5.2 Reatividade do ANCA por imunofluorescência indireta (IFI) quando pesquisado em lâminas fixadas com etanol

5.2.1. Reatividade do p-ANCA clássico observado por IFI

O p-ANCA clássico esteve presente em 1,6% (IC 95%: 0-11,07) dos pacientes com CBP e em 7,1% (IC 95%: 1,77 – 19,7) dos pacientes com CEP/DII+. Esses resultados e o das outras doenças estudadas estão demonstrados na Tabela 2. Não houve significância estatística entre os grupos.

Tabela 2. Reatividade do p-ANCA clássico por imunofluorescência indireta em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis

Grupos (N)	Reatividade N (%)	Intervalo de confiança 95%
Colangite biliar primária (52)	1 (1,9)	0 - 11,25
Colangite esclerosante primária (75)	3 (4,1)	0,9 - 11,58
CEP/DII+ (42)	3 (7,1)	1,77- 19,7
CEP/DII– (33)	0	0 - 12,39
Hepatite autoimune (92)	0	0 – 4,81
Hepatite autoimune tipo1 (31)	0	0 - 13,09
Hepatite autoimune tipo 2 (30)	0	0 - 13,47
Hepatite autoimune tipo 3 (31)	0	0 - 13,09
Controles saudáveis (30)	0	0 - 13,79
Total (249)	4 (1,6)	0,48 – 4,21

CEP/DII+: Colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII–: colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

5.2.2. Reatividade do p-ANCA atípico observado por IFI

O p-ANCA atípico foi identificado em 62 das 249 amostras testadas (24,9%). Foi mais frequentemente detectado na CEP/DII+ (52,4%, IC 95%: 37,72-66,6) do que na CEP/DII– (21,2%, IC 95%: 10,38-38,05), $p=0,005$.

Não foi observada diferença significativa pelo teste de Fisher na frequência do p-ANCA atípico na CEP/DII– em relação a CBP (21,2%, IC 95%: 10,38-38,05 versus 15,4%, IC 95%: 7,74–27,79), $p=0,56$. Porém, houve diferença significativa na

presença do p-ANCA atípico entre os tipos de HAI, $p < 0,001$. Entre os tipos de HAI, o p-ANCA atípico foi mais frequentemente observado na HAI-1 do que na HAI-2 (45,2%, IC 95%: 29,15-62,24 versus 3,3%, IC 95%: 0-18,09, $p < 0,001$) e mais frequentemente observado na HAI-3 do que na HAI-2 (32,3%, IC 95%: 18,46-49,97 versus 3,3%, IC 95%: 0-18,09, $p = 0,012$). Não foi detectada diferença entre a HAI-1 e a HAI-3 ($p = 0,434$). Nenhuma das 30 amostras do grupo controle apresentou o padrão p-ANCA atípico. Esses resultados estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Reatividade do p-ANCA atípico por imunofluorescência indireta em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis

Grupos (N)	Reatividade N (%)	Intervalo de confiança 95%
Colangite biliar primária (52)	8 (15,4)	7,74 – 27,79
Colangite esclerosante primária (75)	29 (38,7)	28,44 – 50
CEP/DII+ (42)	22 (52,4)	37,72 – 66,64
CEP/DII– (33)	7 (21,2)	10,38 – 38,05
Hepatite autoimune (92)	25 (27,2)	19,09 – 37,09
Hepatite autoimune tipo1 (31)	14 (45,2)	29,15 – 62,24
Hepatite autoimune tipo 2 (30)	1 (3,3)	0–18,09
Hepatite autoimune tipo 3 (31)	10 (32,3)	18,46 –49,97
Controles saudáveis (30)	0	0 –13,47
Total (249)	62 (24,9)	19,92 – 30,64

CEP/DII+: Colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII–: Colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

5.2.3. Reatividade do c-ANCA clássico observado por IFI

O padrão c-ANCA clássico esteve presente em três amostras de 249 pacientes (1,2%). Esses resultados estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4. Reatividade do c-ANCA clássico por imunofluorescência indireta em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis

Grupos (N)	Reatividade N (%)	Intervalo de confiança 95%
Colangite biliar primária (52)	1 (1,9)	0 – 11,07
Colangite esclerosante primária (75)	1 (1,3)	0 – 7,87
CEP/DII+ (42)	1 (2,4)	0 – 13,44
CEP/DII– (33)	0	0 – 12,39
Hepatite autoimune (92)	1 (1,9)	0 – 6,49
Hepatite autoimune tipo 1 (31)	1 (3,2)	0 – 17,58
Hepatite autoimune tipo 2 (30)	0	0 – 13,47
Hepatite autoimune tipo 3 (31)	0	0 – 13,09
Controles saudáveis (30)	0	0 – 13,47
Total (249)	3 (1,2)	0,24 – 3,65

CEP/DII+: Colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII–: Colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

5.2.4. Reatividade do c-ANCA atípico observado por IFI

O c-ANCA atípico é um padrão raramente descrito na literatura e esteve presente em apenas dois casos na nossa amostra, de 249 (0,8%), uma amostra de paciente com CEP/DII+ e outra de HAI-2.

5.2.5. Reatividade positiva em neutrófilos fixados em etanol, com padrão ANCA inconclusivo

Em 14 de 249 amostras (5,6%), embora houvesse reatividade em neutrófilos fixados em etanol, não foi possível definir o padrão ANCA por interferência da reatividade para o ANA. Esses resultados estão demonstrados na Tabela 5. O teste de Fisher não evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados (entre os tipos de HAI, $p=0,207$ e entre CEP/DII+ versus CEP/DII-, $p=0,945$).

Tabela 5. Amostras com padrão inconclusivo pela imunofluorescência indireta em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis

Grupos (N)	Reatividade N (%)	Intervalo de confiança 95%
Colangite biliar primária (52)	0	0 – 8,22
Colangite esclerosante primária (75)	6 (8,2)	3,41 – 16,68
CEP/DII+ (42)	2 (4,8)	0,46 – 16,65
CEP/DII- (33)	4 (12,1)	4,21 – 27,93
Hepatite autoimune (92)	7 (7,6)	3,49 – 15,12
Hepatite autoimune tipo1 (31)	1 (3,2)	0 – 17,58
Hepatite autoimune tipo 2 (30)	1 (3,3)	0 – 18,09
Hepatite autoimune tipo 3 (31)	5 (16,7)	6,62– 33,11
Controles saudáveis (30)	1 (3,3)	0 – 18,09
Total (249)	14 (5,62)	3,3 – 9,29

CEP/DII+: Colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII-: Colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

Os resultados obtidos por IFI de todos os padrões observados encontram-se sintetizados na Tabela 6. Observa-se que o ANCA foi mais frequente nos pacientes

com CEP (53,3%) e na HAI(37,0%), sem diferença significativa entre essas duas doenças, $p=1$. Ao se comparar a frequência do ANCA entre os grupos com CEP com ou sem DII, verificou-se que foi significativamente mais frequente na CEP/DII+(69,0%) do que na CEP/DII-(33,3%), $p=0,037$.

Entre os tipos de HAI verificou-se diferença significativa entre HAI-1 versus HAI-2 (51.6% versus 10%, $p=0,011$) e entre HAI-3 versus HAI-2 (48,4% versus 10%, $p=0,024$). Não houve diferença entre CEP/DII+ versus HAI-1 ($p=1$) e CEP/DII+ versus HAI-3 ($p=0,746$) e entre HAI-1 versus HAI-3 ($p=1$) e CBP versus CEP/DII- ($p=1$).

Tabela 6. Reatividade de todos os padrões do ANCA por imunofluorescência indireta em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis

Grupos (N)	p-ANCA clássico	p-ANCA atípico	c-ANCA clássico	c-ANCA atípico	Inconclusivo	Total positivo (%)
CBP (52)	1	8	1	0	0	10 (19,2)
CEP (75)	3	29	1	1	6	40 (53,3)
CEP/DII+ (42)	3	22	1	1	2	29 (69,0)
CEP/DII- (33)	0	7	0	0	4	11 (33,3)
HAI (92)	0	25	1	1	7	34 (37,0)
HAI-1 (31)	0	14	1	0	1	16 (51,6)
HAI-2 (30)	0	1	0	1	1	3 (10)
HAI-3 (31)	0	10	0	0	5	15 (48,4)
Controles (30)	0	0	0	0	1	1 (3,3)
Total (249)	4 (1,6%)	62 (24,9%)	3 (1,2%)	2 (0,8%)	14 (5,6%)	85 (34,1)

CBP: colangite biliar primária; CEP: Colangite esclerosante primária; CEP/DII+: Colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII-: Colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal; HAI-1: Hepatite autoimune tipo 1; HAI-2: Hepatite autoimune tipo 2; HAI-3: Hepatite autoimune tipo 3

5.3 Resultados da reatividade do antiproteinase-3 e do antimieloperoxidase por ELISA

5.3.1 Reatividade antiproteinase-3 (anti-PR3) por ELISA

Anticorpos contra a proteinase 3, que é considerada antígeno alvo do padrão do c-ANCA clássico, foram detectados em 25 de 249 amostras (10,0%). A reatividade ao anti-PR3 foi mais frequente na CEP/DII+ (31,0%, IC 95%: 22,94-50,88) do que na CEP/DII- (12,1%, IC 95%: 4,52-29,46), $p = 0,025$. Os resultados obtidos em todos os grupos estão representados na Tabela 7. As densidades ópticas obtidas para estas amostras estão registradas no gráfico 1.

Figura 2. Reatividade do anti-PR3 por ELISA em densidade óptica de todos os pacientes do estudo

Tabela 7. Detecção do anticorpo antiproteinase-3 por ELISA em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis

Grupos (N)	Reatividade N (%)	Intervalo de confiança 95%
Colangite biliar primária (52)	2 (3,8)	0,32 – 13,72
Colangite esclerosante primária (75)	19 (25,3)	17,27 – 37,18
CEP/DII+ (42)	15 (35,7)	22,94–50,88
CEP/DII– (33)	4 (12,1)	4,52–29,46
Hepatite autoimune (92)	3 (3,3)	1,36 – 11
Hepatite autoimune tipo 1 (31)	1 (3,2)	0 – 17,58
Hepatite autoimune tipo 2 (30)	1 (3,3)	0 – 18,09
Hepatite autoimune tipo 3 (31)	1 (3,2)	0,76 – 21,75
Controles saudáveis (30)	1 (3,3)	0–18,09
Total (249)	25 (10,0)	6,85 – 14,45

CEP/DII+: colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII–: colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

5.3.2. ELISA antimieloperoxidase (anti-MPO)

Anticorpos contra a mieloperoxidase, o antígeno alvo principal do p-ANCA clássico, foram identificados em oito de 249 amostras (3,2%). As densidades ópticas obtidas para estas amostras estão demonstradas no gráfico 2. Os resultados encontrados em todos os grupos estão representados na Tabela 8.

Figura 3. Reatividade do anti-MPO por ELISA em densidade óptica de todos os pacientes do estudo

Tabela 8. Detecção do anticorpo antimieloperoxidase por ELISA em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis

Grupos (N)	Reatividade N (%)	Intervalo de confiança 95%
CBP (52)	0	0 - 8,22
Colangite esclerosante primária (75)	4 (5,3)	1,69 - 13,33
CEP/DII+ (42)	3 (7,1)	1.77 - 19.7
CEP/DII- (33)	1 (3,0)	0 - 16.65
Hepatite autoimune (92)	4 (4,3)	1,36 – 11
Hepatite autoimune tipo 1 (31)	2 (6,4)	0,76 -21,75
Hepatite autoimune tipo 2 (30)	2 (6,7)	0,8 - 22,37
Hepatite autoimune tipo 3 (31)	0	0 - 13,09
Controles saudáveis (30)	0	0 - 13,47
Total (249)	8 (3,2)	1,53 – 6,32

CBP: colangite biliar primária; CEP/DII+: Colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII-: Colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

O resultado geral do ELISA, contendo conjuntamente anti-PR3 e anti-MPO, demonstra que esses autoanticorpos também foram mais frequentes na CEP em relação aos demais grupos, principalmente na CEP/DII+ ($p= 0,002$). Esses resultados encontram-se na Tabela 9. Vale ressaltar que dois pacientes CEP/DII+ apresentaram simultaneamente positividade para o anti-PR3 e anti-MPO.

Tabela 9. Detecção dos anticorpos antimieloperoxidase e antiproteinase-3 por ELISA em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis

Grupos (N)	MPO+ N (%)	PR3+ N (%)	(MPO e PR3)+ N (%)
Colangite biliar primária (52)	0	2 (3,8)	2 (3,8)
Colangite esclerosante primária (75)	4 (5,3)	19* (25,3)	21 (28)
CEP/DII+ (42)	3 (7,1)	15* (31,0)	16 (38,1)
CEP/DII- (33)	1 (3,0)	4 (12,1)	5 (15,2)
Hepatite autoimune (92)	4 (4,3)	4 (4,3)	8 (8,7)
Hepatite autoimune tipo 1 (31)	2 (6,5)	1 (3,2)	3 (9,7)
Hepatite autoimune tipo 2 (30)	2 (6,7)	1 (3,3)	3 (10)
Hepatite autoimune tipo 3 (31)	0	2 (6,4)	2 (6,4)
Controles saudáveis (30)	0	1 (3,3)	1 (3,3)
Total Positivos (249)	8 (3,2)	26 (10,4)	32 (12,8)
Total negativos (249)	241 (96,8)	223 (89,56)	217 (87,1)

*2 pacientes com CEP/DII+ apresentaram reatividade simultânea para o anti-MPO e anti-PR3 por ELISA; CEP/DII+: colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII-: colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

5.4. Avaliação conjunta da reatividade do ANCA por imunofluorescência indireta e da reatividade dos ELISAs antimieloperoxidase e antiproteinase-3

5.4.1. p-ANCA positivo por IFI e negativo por ELISA (IFI+/ELISA-)

Definindo o p-ANCA atípico apenas para as amostras que apresentassem reatividade p-ANCA atípico por IFI, mas fossem negativas para ambos ELISAs (anti-PR3 e anti-MPO), 49 em 249 amostras seriam assim denominadas (19,7%), como pode ser observado na Tabela 10. O teste de Fisher mostrou diferença significativa

na presença de p-ANCA atípico IFI+/ELISA– na CEP/DII+ (35,7%, IC 95%: 22,94 – 50,88) em relação a CEP/DII– (12,1%, IC 95%: 4,21–27,93), $p=0,018$. O teste de Fisher não mostrou diferença significativa entre CEP e HAI ($p = 1$), CEP/DII– e CBP (13,5%, IC 95%: 6,37–25,58, $p= 1$); ao contrário mostrou diferença significativa na reatividade do ANCA IFI+/ELISA– entre os subtipos de HAI ($p=0,001$), sendo mais frequente na HAI-1 do que na HAI-2 ($p=0,001$) e na HAI-3 do que na HAI-2 ($p=0,025$). Não houve diferença significativa entre a HAI-1 e HAI-3, $p=0,426$.

Tabela 10. p-ANCA atípico positivo por imunofluorescência e com negatividade para ELISA antimieloperoxidase e ELISA antiproteinase-3 em diferentes doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis

Grupos (n)	Reatividade N (%)	Intervalo de confiança 95%
Colangite biliar primária (52)	7 (13,5)	6,37–25,58
Colangite esclerosante primária (75)	19 (25,3)	16,79– 36,28
CEP/DII+ (42)	15 (35,7)	22,94 – 50,88
CEP/DII– (33)	4 (12,1)	4,21 – 27,93
Hepatite autoimune (92)	23 (25)	17,22 – 34,78
Hepatite autoimune tipo 1 (31)	13 (41,9)	26,39 – 59,26
Hepatite autoimune tipo 2 (30)	1 (3,3)	0– 18,09
Hepatite autoimune tipo 3 (31)	9 (29,0)	15,94 – 46,75
Controles saudáveis (30)	0	0 - 13,47
Total (249)	49 (19,7)	15,2 – 25,08

CEP/DII+: colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII–: colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

5.4.2. Reatividade do ANCA por imunofluorescência acrescida da positividade por ELISA do antimieloperoxidase e antiproteinase-3

Com o objetivo de averiguar a reatividade global dos autoanticorpos relacionados aos neutrófilos por IFI e ELISA, consideramos todos os resultados positivos pelas duas técnicas conjuntamente. Assim como no ANCA observado por IFI, mesmo após adicionarmos os resultados ANCA IFI-/ELISA+, os pacientes com CEP (61,3%) e HAI (41,3%), $p=0,038$, mantiveram a maior frequência de reatividade. O grupo CEP/DII+ apresentou frequência estatisticamente maior de ANCA do que CEP/DII- ($p=0,002$). Nos subtipos de HAI, a reatividade global por imunofluorescência e ELISA não foi estatisticamente mais frequente na HAI-1 e HAI-3 do que na HAI-2 (HAI-1 versus HAI-2, $p=0,095$; HAI-1 versus HAI-3, $p=1$; HAI-2 versus HAI-3, $p=0,275$). Não houve diferença estatisticamente significantes entre os subgrupos de CEP e HAI (CEP/DII+ versus HAI-1, $p=0,213$; CEP/DII+ versus HAI-3, $p=0,069$; CEP/DII- versus HAI-1, $p=0,87$). Na Tabela 11 estão representados esses resultados.

Tabela 11. Positividade global do ANCA por imunofluorescência acrescida da positividade por ELISA do antimieloperoxidase e antiproteinase-3

Grupo	Positividade do ANCA por IFI N (%)	Positividade do ELISA no grupo ANCA+ por IFI N(%)		Positividade do ELISA no grupo ANCA– N(%)		Positividade ELISA + IFI N (%)
		Anti-MPO+	Anti-PR3+	Anti-MPO+	Anti-PR3+	
CBP	10/52 (19,2)	0/10	1/10	0	1/42 (2,4)	11/52 (21,2)
CEP	40/75 (53,3)	2/40 (5)	15/40*(37,5)	2/35 (5,7)	4/35 (11,4)	46/75 (61,3)
CEP/DII+	29/42 (69,0)	2/29 (6,9)	11/29* (37,9)	1/13 (7,7)	4/13 (30,8)	34/42 (81,0)
CEP/DII–	11/33 (33,3)	0/11	4/11 (36,4)	1/22 (4,5)	0	12/33 (36,4)
HAI	34/92 (37)	1/34 (2,9)	2/34 (5,9)	3/58 (5,2)	1/58 (1,7)	38/92 (41,3)
HAI-1	16/31 (51,6)	1/16 (6,2)	1/16 (6,2)	1/15 (6,7)	0/15	17/31 (54,8)
HAI-2	3/30 (10)	0/3 (0)	0/3 (0)	2/27 (7,4)	1/27 (3,7)	6/30 (20)
HAI-3	15/31 (48,4)	0/15	1/15 (6,7)	0/16 (0)	0	15/31 (48,4)
Controle	1/30	0	1	0	0	1/30 (3,33)
Total	85/249 (34,1)	3/249 (1,2)	19/249 (7,6)	5/164 (3,0)	6/164 (3,7)	96/249 (38,6)

*2 pacientes com CEP/DII+ apresentaram reatividade simultânea para o anti-MPO e anti-PR3 por ELISA.

CBP: colangite biliar primária; HAI: Hepatite autoimune; CEP/DII+: colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal.

CEP/DII–: colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal; anti-MPO: antimieloperoxidase; anti-PR3: antiproteinase-3

5.5 Anticorpos antinucleares (ANA)

A presença do ANA foi avaliada em todas as amostras para descartar interferência na leitura do padrão ANCA. Foram consideradas amostras positivas a partir do título de 1/40, totalizando 139 de 249 (55,8%) amostras positivas. As Tabelas 12, 13 e 14 exibem a presença dessa reatividade e dos principais padrões observados do anticorpo antinuclear nos diferentes grupos do estudo.

Tabela 12: Principais padrões do anticorpo antinuclear presentes na colangite esclerosante primária

Padrões	CEP/DII+ N = 42 (%)	CEP/DII- N = 33 (%)
Pontilhado quase homogêneo	2(4,8)	1 (3,0)
Homogêneo	4 (9,5)	1 (3,0)
Pontilhado fino	9 (21,4)	8 (24,2)
Pontilhado fino denso	0	0
Pontilhado grosso	0	0
Pontilhado grosso do tipo reticulado	1(2,4)	0
Centromérico	0	1 (3,0)
Total de pacientes positivos	16 (38,1)	11 (33,2)

CEP/DII+: colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII-: colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

Tabela 13: Principais padrões do anticorpo antinuclear presentes nos subtipos de hepatite autoimune

Padrões	HAI-1	HAI-2	HAI-3
	N=31 (%)	N=30 (%)	N=31 (%)
Pontilhado quase homogêneo	0	1(3,3)	2 (6,4)
Homogêneo	6 (19,4)	1(3,3)	5 (16,1)
Pontilhado fino	11 (35,5)	7 (23,3)	12 (38,7)
Pontilhado fino denso	0	0	0
Pontilhado grosso	0	0	0
Pontilhado grosso do tipo reticulado	1 (3,2)	1 (3,3)	0
Centromérico	0	0	1 (3,2)
Total de pacientes positivos	18 (58,1)	10 (33,2)	20 (64,4)

HAI: hepatite autoimune

Tabela 14: Principais padrões do anticorpo antinuclear presentes na colangite biliar primária e controles saudáveis

Padrões	Colangite Biliar	Controles
	Primária N=52 (%)	N=30 (%)
Pontilhado quase homogêneo	0	0
Homogêneo	0	0
Pontilhado fino	13 (25)	5 (16,7)
Pontilhado fino denso	0	2 (6,7)
Pontilhado grosso	1 (1,9)	0
Pontilhado grosso do tipo reticulado	0	0
Centromérico	17(32,7)	0
Envelope nuclear	1 (1,9)	0
Múltiplos pontos isolados	5 (9,6)	0
Total de pacientes positivos	37 (71,2)	7 (23,3)

5.6 Comparação entre a reatividade do ANCA em neutrófilos fixados em etanol por imunofluorescência indireta e a do anti-MPO e anti-PR3 por ELISA

Esperava-se que a presença dos padrões clássicos do p-ANCA e c-ANCA observados pela IFI estivesse associada à reatividade para o anti-MPO e anti-PR3 respectivamente.

5.6.1. Comparação entre a reatividade do p-ANCA clássico em neutrófilos fixados em etanol e a do ELISA anti-MPO

No presente estudo, não houve evidência de discordância marginal entre a presença do p-ANCA clássico observado na IFI, 1,6% (IC 95%: 0,48 – 4,21) e o ELISA anti-MPO 3,2% (IC 95%: 1,53 – 6,32), McNemar, $p = 0,388$. Contudo, não houve evidência de concordância central, coeficiente kappa = -0,022 ($p = 0,713$), refletida na concordância positiva (0%), conforme apresentado nas Tabela 15 e 16. Observa-se que toda a concordância foi derivada dos resultados negativos. Nenhum resultado positivo foi concordante pelos dois métodos.

Tabela 15. Avaliação de concordância entre a reatividade ao anti-MPO por ELISA e o p-ANCA clássico observado por imunofluorescência indireta

	Anti-MPO+	Anti-MPO–	Total
p-ANCA clássico IFI+	0	4 (1,6%)	4 (1,6%)
p-ANCA clássico IFI–	8 (3,2%)	237 (95,2%)	245 (98,4%)
Total	8 (3,2%)	241 (96,8%)	249

Anti-MPO: anticorpo antimieloperoxidase; p-ANCA clássico: anticorpo anticitoplasma de neutrófilos, padrão perinuclear; IFI: imunofluorescência indireta

Tabela 16. Avaliação de concordância do p-ANCA clássico por imunofluorescência indireta pelo teste kappa

p-ANCA concordância (n)	Concordância % (IC 95%)	N
p-ANCA concordância geral (0+237)	95,18 (91,68 – 97,31)	249
p-ANCA concordância negativa (237)	95,18 (91,68 – 97,31)	249
p-ANCA concordância positiva (0)	0	12 (4+8+0)

ANCA: anticorpo anticitoplasma de neutrófilo; p-ANCA: anticorpo anticitoplasma de neutrófilos, padrão perinuclear

5.6.2. Comparação entre reatividade do c-ANCA clássico em neutrófilos fixados em etanol e a do ELISA anti-PR3

O c-ANCA clássico por IFI esteve presente em 1,2% (3/249) dos pacientes analisados (IC 95% = 0,24 – 3,65), enquanto o ELISA anti-PR3 apresentou uma positividade de 10,0% (IC 95% = 6,85 – 14,45), estatística kappa = 0,05 (p=0,18) e McNemar, p< 0,001, conforme demonstrado na Tabela 17. Isso significa que não houve evidência de concordância central para o teste kappa e houve evidência de discordância marginal pelo teste de McNemar. Para os negativos, a concordância foi de 89,2% (IC 95% = 84.52 - 92.79), conforme apresentado na Tabela 18. Portanto, não há evidências de que o c-ANCA clássico observado por IFI tenha concordância com a reatividade do

anti-PR3 nas doenças avaliadas no presente estudo. Na Tabela 19 há exemplos dessa discordância entre o encontrado na IFI e ELISA.

Tabela 17: Avaliação de concordância do c-ANCA clássico com a reatividade do antiproteinase3 (anti-PR3)

	Anti-PR3+	Anti-PR3–	Total
c-ANCA clássico IFI+	1 (0,4%)	2 (0,8%)	3 (1,2%)
c-ANCA clássico IFI–	24 (9,6%)	222 (89,2%)	246 (98,8%)
Total	25 (10,0%)	224 (90,0%)	249

c-ANCA: anticorpo anticitoplasma de neutrófilo, padrão citoplasmático clássico; anti-PR3: anticorpo antiproteinase-3.

Tabela 18: Avaliação de concordância do c-ANCA clássico pelo teste kappa

ANCA	Concordância (IC 95%)	N
c-ANCA concordância geral (1+222)	89,6 (85,09– 92,82)	249
c-ANCA concordância negativo (222)	89,5 (85,04– 92,79)	248 (24+2+222)
c-ANCA concordância positivo (1)	3,7 (0 – 19,8)	27 (1+24+2)

ANCA: anticorpo anticitoplasma de neutrófilo; c-ANCA: anticorpo anticitoplasma de neutrófilos padrão citoplasmático clássico

Tabela 19: Positividade do antimieloperoxidase e antiproteinase-3 em amostras reativas para o c-ANCA clássico segundo a imunofluorescência indireta

Grupo	N	Anti-MPO	Anti-PR3
Colangite biliar primária	1	Negativo	Negativo
Hepatite autoimune tipo 1	1	Positivo	Negativo
CEP/DII+	1	Negativo	Positivo

CEP/DII+: colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; N= número de pacientes por doença; anti-MPO: anticorpo antimieloperoxidase; anti-PR3: anticorpo antiproteinase-3

5.6.3. Reatividade do p-ANCA atípico (por imunofluorescência indireta) em neutrófilos fixados em etanol e sem reatividade do antiproteinase-3 e/ou antimieloperoxidase (por ELISA)

Para o p-ANCA atípico, identificado em 62 das 249 amostras testadas (24,9%), a maioria dos casos (49/62, 79%) não exibiu reatividade para o anti-MPO ou anti-PR3. Treze pacientes com reatividade para o p-ANCA atípico pela IFI exibiram reatividade para pelo menos um dos ELISA. Doze amostras apresentaram positividade para o anti-PR3 e uma apresentou positividade simultânea para o anti-MPO e o anti-PR3. No grupo p-ANCA atípico negativo 11 foram positivos para anti-PR3, seis para o anti-MPO, e um apresentou reatividade para os dois ELISAs, Tabelas 20 e 21.

Tabela 20. Resultados dos ELISAs antimieloperoxidase e antiproteinase-3 nas amostras positivas para o p-ANCA atípico em doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis.

Grupos	p-ANCA atípico positivo e ELISA positivo* N (%)	p-ANCA atípico positivo e ELISAs negativos N (%)
Colangite biliar primária (52)	1 (1,9)	7 (13,5)
Colangite esclerosante primária (75)	10 (13,3)	19 (25,3)
CEP/DII+ (42)	7 (16,6)	15 (35,7)
CEP/DII– (33)	3 (9,1)	4 (12,9)
Hepatite autoimune (92)	2 (2,2)	23 (25)
Hepatite autoimune tipo1 (31)	1 (3,2)	13 (41,9)
Hepatite autoimune tipo 2 (30)	0	1 (3,3)
Hepatite autoimune tipo3 (31)	1 (3,2)	9 (29,0)
Controles (30)	0	0
Total (249)	13 (5,2)	49 (19,7)

*: pelo menos um dos ELISAs (anti-MPO ou anti-PR3) positivo; CEP/DII+: colangite esclerosante primária associada à doença inflamatória intestinal; CEP/DII–: colangite esclerosante primária não associada à doença inflamatória intestinal

Tabela 21. Reatividade do p-ANCA atípico com a presença ou ausência de reatividade para o antimieloperoxidase e/ou antiproteinase-3

	Anti-PR3 e/ou anti-MPO (positivo)	Anti-PR3 e anti-MPO (negativo)	Total
p-ANCA atípico IFI+	13 (5,2%)	49 (19,7%)	62 (24,9%)
p-ANCA atípico IFI–	17 (6,8%)	170 (68,3%)	187 (75,1%)
Total	30 (12%)	219 (88%)	249

ANCA: anticorpo anticitoplasma de neutrófilo; p-ANCA: anticorpo anticitoplasma de neutrófilo padrão perinuclear clássico; IFI: imunofluorescência indireta; anti-PR3: antiproteinase-3; anti-MPO: antimieloperoxidase

5.7. Avaliação dos anticorpos específicos contra neutrófilos fixados em etanol sem reatividade ao ELISA anti-PR3 e/ou anti-MPO

Também foi avaliada a reatividade ANCA como sendo na verdade anticorpos contra neutrófilos (NSA), e não possuírem reatividade anti-PR3 e/ou anti-MPO por ELISA. Totalizaram 65 amostras, conforme demonstrado na Tabela 22. Nesse caso foram incluídos todos os pacientes com reatividade para o ANCA (c-ANCA e p-ANCA clássicos e atípicos e p-ANCA inconclusivo) que não apresentavam reatividade anti-MPO e/ou anti-PR3. Dois pacientes apresentaram simultaneamente reatividade para os dois ELISAs. Ao se comparar os grupos, não houve diferença significativa entre os grupos HAI versus CEP ($p = 1$), HAI versus CBP ($p = 0,156$) e CEP versus CBP ($p = 0,156$). Também não houve significância estatística quando se comparou CEP/DII- versus CEP/DII+ ($p = 0,541$), CEP/DII- versus CBP ($p = 1$), CEP/DII+ versus CBP ($p = 0,156$), HAI-1 versus HAI-2 ($p = 0,062$), HAI-3 versus HAI-2 ($p = 0,062$) e HAI-1 versus HAI-3 ($p = 1$).

Tabela 22. Anticorpos específicos contra neutrófilos (NSA) por imunofluorescência e com negatividade para ELISA antimieloperoxidase e ELISA antiproteinase-3 nas diferentes em doenças autoimunes hepáticas e em controles saudáveis

Grupos (n)	Reatividade N (%)	Intervalo de confiança 95%
Colangite biliar primária (52)	9 (17,3)	9,15 – 29,96
Colangite esclerosante primária (75)	25 (33,3)	23,68 – 44,61
CEP/DII+ (42)	18 (42,8)	29,11 – 57,81
CEP/DII– (33)	7 (21,2)	10,38 – 38,05
Hepatite autoimune (92)	31 (33,7%)	24,84 – 43,86
Hepatite autoimune tipo 1 (31)	14 (45,2)	29,15 – 62,24
Hepatite autoimune tipo 2 (30)	3 (10)	2,66 – 26,42
Hepatite autoimune tipo 3 (31)	14(45,2)	29,15 – 62,24
Controles saudáveis (30)	0	0 – 13,47
Total (249)	65 (26,1)	21,03 – 31,91

CEP/DII+: colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal; CEP/DII–: colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal

5.8. Reatividade simultânea ao anti-PR3 e ao anti-MPO por ELISA

Dois dos 249 pacientes (0,80%) apresentaram simultaneamente positividade para o anti-MPO e para o anti-PR3, conforme demonstrado no gráfico 3. Ambos pacientes tinham CEP/DII+ e, pela IFI, um apresentou o padrão p-ANCA atípico e outro c-ANCA atípico, o que também exemplifica a dificuldade em estabelecer concordância entre o que é observado na IFI e o que é encontrado no ELISA.

Figura 4: Resultados dos valores de densidade óptica obtidos nas leituras de ELISA antiproteinase-3 e antimieloperoxidase simultaneamente

Discussão

6. DISCUSSÃO

Em relação aos dados demográficos, os portadores de CBP serem mais idosos que os portadores de CEP está de acordo com os dados da literatura. A CBP é tipicamente uma doença que acomete principalmente mulheres com mais de 40 anos e a CEP indivíduos jovens com menos de 40 anos de idade. Não houve diferença nessa variável entre os portadores de CEP com ou sem doença inflamatória intestinal.

Entre os tipos de HAI, o fato dos portadores de HAI-2 serem mais jovens e os portadores de HAI-3 os mais idosos também está de acordo com a literatura, embora a significância estatística tenha sido estabelecida apenas entre esses dois tipos. Não houve significância entre os tipos HAI-2 e HAI-1 e entre HAI-3 e HAI-1. Isso se justifica pelo fato de que a HAI-1 com marcador sorológico exclusivo do ASMA-VGT (especificidade anti-actina F) ter ampla distribuição em todas as faixas etárias. O fato da mediana de idade para a HAI-2 ser de 21,2 anos chega a ser surpreendente, porém pode ser explicado por terem sido incluídos pacientes de ambulatórios de adultos. A HAI-2, embora infrequente nessa faixa etária, pode ser diagnosticada esporadicamente. Só foram incluídos pacientes que tiveram início em faixa etária pediátrica que atingiram a idade adulta, e em algumas situações em que houve recidiva da doença após a transferência do acompanhamento pediátrico para a hepatologia de adultos. Já a HAI-3 tem sido raramente diagnosticada em nosso meio em faixa pediátrica abaixo de 10 anos de idade.

Em relação à constatação do gênero masculino ser estatisticamente mais frequente em homens na CEP, isso também é fato consumado. O que foi diferente foi a CEP/DII- ter sido mais frequentemente diagnosticada em mulheres. Em relação a CBP e os tipos de HAI, em todas as situações o diagnóstico foi estabelecido mais frequentemente em mulheres, o que está de acordo com o publicado na vasta literatura a respeito dessas enfermidades. Fica a observação interessante da HAI-3 ter sido exclusivamente diagnosticada em mulheres, o que conferiu diferença significativa quando comparada com a HAI-1. Essa característica de exclusividade para o sexo feminino não foi descrita na literatura, porém a caracterização sorológica da HAI-3, como foi estabelecida no presente estudo, não foi feita previamente.

O p-ANCA clássico esteve infrequentemente presente nos grupos estudados sendo detectado em um paciente com CBP e em três com CEP/DII+. Em nenhuma dessas amostras houve reatividade para o anti-MPO por ELISA. Em estudo de Frenzer *et al.* em 68 pacientes (24 com colite ulcerativa, 34 com doença de Crohn e 10 controles), apenas três pacientes com colite ulcerativa (12,5% dos pacientes com colite ulcerativa ou 5,2% dos portadores de doença inflamatória intestinal) apresentaram esse marcador.³⁶ Nesse estudo não havia nos grupos estudados referência a portadores de CEP. Uma diferença metodológica desse estudo com o presente foi que, para a identificação dos padrões do ANCA, foram utilizados substratos fixados em etanol e formaldeído. Para muitos estudiosos, para a correta identificação do padrão p-ANCA clássico e do p-ANCA atípico há necessidade de ser realizado esse estudo comparativo com substratos fixados de forma diferente, e para outros não há essa exigência incluindo o consenso internacional de

padronização do ANCA.³⁷ Algumas vezes é difícil estabelecer uma comparação entre os estudos realizados porque a nomenclatura nem sempre fica clara. Por exemplo, no estudo de Zauli *et al.* em que estudaram a frequência do ANCA na HAI tipo 1 e tipo 2, igualmente aos nossos resultados, nenhum portador de HAI-2 apresentou reatividade para p-ANCA, no entanto, 65% dos pacientes com HAI-1 apresentavam p-ANCA.⁴⁴ A metodologia desse estudo foi similar à desse estudo, só com neutrófilos fixados em etanol, todavia certamente estão incluídos nesses resultados reatividade para o p-ANCA atípico. Não houve nesses estudos a determinação do anti-MPO por ELISA.

Quanto ao c-ANCA clássico, apenas 3 amostras de 249 pacientes foram reativas, uma de CBP, uma de CEP/DII+ e uma de HAI-1. Esses resultados demonstram que esse padrão é realmente infrequente nas doenças autoimunes hepáticas. Terjung *et al.*, da mesma forma, encontraram apenas dois pacientes em 102 (2%) portadores de DII e/ou doenças autoimunes hepáticas com esse padrão de ANCA.²⁷ Nesse estudo, diferentemente do presente, para a identificação dos padrões do ANCA foram utilizados substratos fixados em etanol e formaldeído. Mas essa diferença não influenciou os resultados, pois, para o padrão c-ANCA, a fixação de neutrófilos em etanol fornece não interfere na leitura do padrão citoplasmático. Apenas uma amostra de c-ANCA clássico foi simultaneamente reativa para o anti-PR3 por ELISA.

Como esperado, o padrão mais frequentemente encontrado no estudo foi o p-ANCA atípico em 24,9% de todas as amostras testadas, sendo mais detectado na CEP/DII+ (52,4%) e na HAI-1 (45,2%). Embora com frequência menor que em outros estudos, é exatamente na CEP e na HAI-1 que esse anticorpo é mais comumente detectado nas doenças autoimunes hepáticas. A

menor frequência na CEP/DII+ pode ser explicada por nem sempre ter sido utilizada a amostra inicial do paciente antes da administração de corticoide e/ou imunossupressor. Isso pode ser explicado pelo fato de muitos pacientes chegarem para serem avaliados pela doença hepática após já estarem em tratamento para a doença inflamatória intestinal. Quanto a HAI-1, tentou-se evitar esse viés ao serem utilizados soros iniciais ou em momento de recidiva ou na pior da hipótese na vigência de atividade bioquímica, histológica ou sorológica (reatividade para outro anticorpo marcador da HAI-1 em título maior que 1/80). O que se destacou nos resultados foi exatamente a diferença significativa entre a reatividade do p-ANCA atípico na CEP/DII+ em relação a CEP/DII- ($p = 0,005$). Essa diferença poderia ser até maior uma vez que na última situação não há razão de se administrar corticoide e/ou imunossupressor a formas de CEP/DII-, a não ser que haja sobreposição da CEP com a HAI (casos que não foram incluídos nesse ensaio) ou associação com outra doença autoimune extra-hepática (lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide), o que ocorreu em poucos casos. Outro fato que pode ter aumentado a frequência do p-ANCA atípico na CEP/DII- é a possibilidade da não simultaneidade do diagnóstico da doença inflamatória intestinal em portadores de CEP. Ademais, embora tenha sido feita colonoscopia em todos os pacientes, biópsias colônicas não foram realizadas de forma sistemática, em todos os casos de CEP.

Essa diferença na frequência do p-ANCA atípico entre a CEP/DII+ e CEP/DII-nem sempre foi documentada nos poucos estudos realizados com esse intuito. Assim, Seibold *et al.* referiram reatividade para o p-ANCA de 83%

em pacientes com colite ulcerativa, 88% em pacientes com CEP/DII+, 40% na CEP/DII- e em 25% dos portadores de doença de Crohn.⁴⁵ Diferentemente do presente estudo, a reatividade do p-ANCA foi considerada a partir de 1/10 e por esse motivo pode explicar a maior frequência desse marcador em comparação com nossos resultados. Por outro, lado a pesquisa desse anticorpo baseou-se em neutrófilos fixados com etanol, como realizado em nosso estudo. No estudo francês de Claise *et al.*, com a confirmação do padrão do p-ANCA em neutrófilos fixados em formaldeído, e com positividade definida a partir de 1/20, a frequência do p-ANCA foi para a CEP/DII+ e CEP/DII- de 60 e 25% respectivamente.⁴⁶ Essa diferença também foi pontuada por Roozendaal *et al.* em relação à reatividade significativamente maior do antilactoferrina por ELISA na CEP/DII+ em relação à CEP/DII-.⁴⁷ A lactoferrina é um dos antígenos-alvo que poderia estar relacionado ao p-ANCA da doença inflamatória intestinal e das doenças autoimunes do fígado.

De maneira inexplicável alguns estudos encontraram reatividade similar nas duas situações clínicas de CEP com ou sem associação a doença inflamatória intestinal. Duerr *et al.* por meio de duas técnicas, ELISA com neutrófilos fixados e imunofluorescência indireta com leucócitos fixados em etanol demonstraram maior frequência de anticorpos antineutrófilos e p-ANCA respectivamente em portadores de colite ulcerativa e CEP (mesmo naqueles pacientes sem doença inflamatória intestinal) do que em portadores de CBP, hepatite B e hepatite crônica não A não B.⁴⁸ O padrão p-ANCA foi exclusivamente encontrado nos pacientes com CEP e colite ulcerativa. Em estudo de Hardarsson *et al.*, seis de oito amostras de CEP/DII-, 14 de 21

amostras de CEP/DII+ (66,6%) foram positivos em ensaio utilizando neutrófilos fixados em etanol e formalina, com reatividade que variou de 1/40 a 1/1280.⁴⁹ Além de número muito reduzido de amostras analisadas, em especial no grupo CEP/DII-, a interpretação do que seria p-ANCA fixado em formalina para definir o padrão encontrado em nas doenças inflamatórias intestinais e nas doenças autoimunes hepáticas foi completamente diferente do que apontado por outros pesquisadores.²⁷ Em recente publicação, analisando uma corte de 241 portadores de CEP da Escandinávia (192 pacientes com doença inflamatória intestinal, 82%), com reatividade do ANCA definida apenas em neutrófilos fixados em etanol (INOVA®), a partir de títulos de 1/20, não houve diferença significativa quanto a presença e ausência de doença inflamatória intestinal (84% versus 75%).⁵⁰ Nesse estudo não foi feita explicitamente qualquer diferença quanto à reatividade para o p-ANCA clássico e o p-ANCA atípico.⁵¹ A diferença marcante entre os pacientes p-ANCA positivos e negativos foi quanto aos marcadores genéticos alelo HLA B8 (43% versus 25%, $p = 0,012$) e alelo DR3 (43% versus 25%, $p = 0,015$).

A reatividade do p-ANCA atípico na HAI é fato conhecido e é certamente por esse motivo que o Grupo Internacional da Hepatite Autoimune (IAIHG) considera-o como marcador da doença nos casos em que não tenham sido detectados outros marcadores clássicos da doença (anticorpo antimúsculo liso, antinúcleo e antimicrosoma de fígado e rim tipo 1). No estudo mais emblemático, encontraram a expressiva cifra de 96% (100 de 104 pacientes testados) reatividade por ELISA utilizando neutrófilos fixados em placas.⁵² O que mais impressiona nesse estudo é que 92% desses positivos foram reativos também por imunofluorescência indireta em neutrófilos fixados

em etanol, com reatividade a partir de 1/50. Como no ELISA o material antigênico fixado na placas é toda a célula compreende-se que em pacientes com HAI-1, com reatividade para antígenos nucleares (histona e SSA/Ro) e antígenos citoplasmáticos [F-actina, o-fosfoerina (Sep)-tRNA:selenocisteína (Sec)-tRNA sintase] possam apresentar elevada reatividade ao ELISA. No entanto a expressiva reatividade do p-ANCA à imunofluorescência indireta tornaria esse autoanticorpo o mais frequente marcador da HAI. Nossos resultados, mesmo com títulos a partir de 1/20, foram inferiores a 50%.

A pequena frequência do p-ANCA atípico na HAI-2 está de acordo com os dados publicados na literatura, quando é raramente observado.⁵³ Porém a sua presença em portadores de HAI-3 (anti-SLA/LP isolado) é fato novo, pois não foi descrita em outros estudos publicados. A menor prevalência de p-ANCA atípico nos pacientes com HAI-2 reforça a distinção entre os tipos 1 e 2 e um argumento a mais para considerar a HAI com o marcador anti-SLA/LP semelhante a HAI-1 cujo principal marcador é o ASMA VGT/antiactina F, pois nesses dois subtipos não houve diferença significativa.

Além dos padrões acima discutidos ainda foram observados o padrão c-ANCA atípico em dois pacientes, um com CEP/DII+ e outro HAI-2. Pouco tem sido publicado sobre esse padrão e é até discutível se o que foi identificado nesses doentes é o mesmo descrito em pacientes em uso de altas doses de imunoglobulina intravenosa ou o identificado nos lotes de imunoglobulina de diversos fabricantes.⁵⁴ Outro padrão difícil de ser comparado com outros resultados é o padrão inconclusivo, muitas vezes derivado de interferência com reatividade nuclear concomitante. Em razão dessa interferência, sempre é

recomendável a pesquisa do anticorpo antinúcleo para esclarecer padrões inconclusivos.

Em razão das contradições no conceito dos padrões do ANCA, da falta de concordância das formas de fixação do substrato e da discordância dos resultados da imunofluorescência indireta e ELISA, analisamos também a reatividade global do ANCA por imunofluorescência indireta, independentemente do padrão encontrado. Assim, o ANCA foi mais frequentemente encontrado na CEP e na HAI, sem diferença significativa na frequência entre essas doenças ($p = 1$). As diferenças significantes observadas entre a CEP/DII+ e CEP/DII- ($p = 0,037$); entre HAI-1 e HAI-2 ($p = 0,011$) e entre HAI-3 e HAI-2 ($p = 0,024$) foram mantidas. Portanto, mesmo considerando conjuntamente os padrões p-ANCA clássico e atípico, os padrões c-ANCA clássico e atípico e o padrão p-ANCA inconclusivo, as diferenças de reatividade discutidas anteriormente para o p-ANCA atípico não modificariam.

Quanto ao resultado dos ELISA anti-PR3, o único grupo que apresentou reatividade acima de 10% foi a CEP, porém ao se analisar os subgrupos de CEP, a frequência foi significativamente maior no grupo com doença inflamatória associada ($p = 0,025$). Reatividade importante do anti-PR3 na colite ulcerativa foi recentemente descrita, a despeito da baixa frequência do c-ANCA clássico na doença inflamatória intestinal, o que nos faz extrapolar que a reatividade do p-ANCA atípico ofusca frequentemente aquele padrão. Já em 2008, Trevisin *et al.* comparando a performance de imunoensaio por citometria de fluxo para detectar PR3-ANCA e MPO-ANCA com diferentes ensaios comerciais e “in house”, detectaram frequência de 27% e 17% para os respectivos padrões.⁵⁵ No entanto, nesse estudo houve o viés de terem sido

selecionados 22 soros de pacientes com doença inflamatória intestinal com reatividade para o c-ANCA (oito pacientes) e p-ANCA (14 pacientes). Em 2013 Mahler et al, encontraram reatividade elevada para o anti-PR3 em 31,1% de pacientes com colite ulcerativa e em 1,9% de pacientes com doença de Crohn por metodologia diferente da empregada presentemente, a quimioluminescência, enquanto por ELISA, igualmente ao utilizado no presente estudo, a reatividade foi de apenas 6% na colite ulcerativa e ausente na doença de Crohn.²⁹ Nesse estudo de 2013, além da maior reatividade do PR3-ANCA na colite ulcerativa em relação à doença de Crohn, sua presença foi relacionada à maior extensão da doença. Não foi objeto de estudo no presente estudo, a avaliação clínica dos pacientes de acordo com o padrão do ANCA, todavia esse tipo de análise pode vir a ser útil na definição prognóstica dos pacientes com doença inflamatória intestinal.

Resultados mais próximos aos nossos foram encontrados por Stinton *et al.* que relataram reatividade anti-PR3 de 38,5% e 23,4% por quimioluminescência e ELISA na CEP respectivamente (74,6% com doença inflamatória intestinal associada).⁵⁵ Com o ensaio de ELISA nesse estudo, não houve diferença entre os pacientes com CEP/DII+ [colite ulcerativa (32/111, 28,8%), doença de Crohn (6/27, 22,2%)]. Da mesma forma não houve diferença significativa entre os portadores de CEP/DII+ (26,8%) e CEP/DII- (16,1%, $p = 0,14$]. Os valores obtidos por quimioluminescência são mais expressivos, mas não se observou significância em nenhuma das comparações mencionadas acima (40,5% colite ulcerativa, 48,1% doença de Crohn e 0% forma indeterminada versus 30,6% CEP/DII-, $p = 0,22$). Embora a reatividade do anti-PR3 por quimioluminescência tenha sido significativamente mais

frequente nos pacientes com CEP quando comparada com a reatividade em outras doenças autoimunes (21,5% HAI e 13,2% CBP), por ELISA ela foi infreqüentemente observada (7,7% HAI e 0% CBP) como em nosso estudo (4,3% HAI e 3,8% CBP).

Pelo exposto nos diversos estudos mencionados nessa discussão, percebe-se claramente que, tanto pela IFI quanto por técnicas antígeno-específicas, por ELISA ou por quimioluminescência, os resultados dos diferentes estudos são muito discordantes para a detecção do ANCA, do anti-PR3 e do anti-MPO. A explicação para tal fato deve envolver critérios diagnósticos das doenças hepáticas, uso de corticoides, imunossupressores, biológicos e colectomia nos diferentes grupos de pacientes no momento da coleta do sangue. Com o uso de ensaios comerciais, tanto para imunofluorescência indireta quanto para ELISA, em vez de ensaios “in house”, esperavam-se resultados mais uniformes o que não foi observado. Por essa razão fica difícil chegar a conclusões abrangentes e os resultados obtidos em uma coorte de pacientes não podem ser extrapolados para outras.

Quanto ao anti-MPO por ELISA, os resultados foram muito pouco expressivos para tecer algum tipo de discussão, mas essa reatividade foi identificada apenas em pacientes com HAI e CEP, sem nenhuma distribuição particular.

Na tentativa de restringir o conceito de considerar p-ANCA atípico apenas para amostras de soro que apresentassem reatividade para o p-ANCA atípico por imunofluorescência indireta e negatividade para o ELISA, das 62 amostras reativas para o p-ANCA atípico 13 foram positivas para um dos ELISAs. Assim 49 amostras seriam p-ANCA atípico+/ELISA negativo.

Persistiram diferenças estatisticamente significantes entre CEP/DII+ versus CEP/DII- ($p = 0,018$), HAI-1 versus HAI-2 ($p = 0,001$) e HAI-3 versus HAI-3 versus HAI-2 ($p = 0,025$). Não houve diferença significativa entre CEP/DII- versus CBP, HAI-1 versus HAI-3 e entre CEP e HAI. Ao contrário, verificando a reatividade geral por imunofluorescência indireta acrescida da reatividade apenas por ELISA a diferença permaneceu significativa apenas ao comparar CEP/DII+ com CEP/DII-. Não houve diferença significativa entre os tipos de HAI porque o grupo HAI-2 foi aquele em que houve maior proporcional com a reatividade do ELISA (de 10 para 20%).

Após essa análise de reatividade do ANCA por imunofluorescência e do anti-PR3 por ELISA pode-se constatar que do ponto de vista de autoanticorpos, a CEP/DII+ teve comportamento diferente da CEP/DII-. Quando os ensaios sorológicos eram realizados com testes "in house" era mais fácil explicar as diferenças encontradas entre resultados de diferentes locais de estudo. No entanto, os estudos têm utilizado ensaios de mesmas companhias internacionais e por essa razão essas diferenças só podem ser explicadas por diferenças ambientais, genéticas ou critérios diagnósticos diferentes. Essa última possibilidade fica mais difícil porque os critérios utilizados no presente estudo são exatamente os mesmos utilizados em outros com resultados diferentes. Uma possibilidade ainda não discutida poderia ser que, na população Escandinávia em que a colangite esclerosante primária é muito prevalente, pacientes com diagnóstico de CEP sem doença inflamatória intestinal poderiam pertencer ao mesmo grupo com doença inflamatória intestinal ainda não revelada clinicamente. Sabe-se que a concomitância das

duas doenças pode não ser simultânea, mas isso é apenas especulação. Outra explicação para essas diferenças nesse tipo de estudo está ligada aos marcadores genéticos. Nesse sentido, estudo de Hov *et al.* destaca a importância do perfil de HLA nos pacientes com CEP ANCA positivo (os resultados foram semelhantes ao se restringir aos resultados do p-ANCA) versus CEP ANCA negativo para o HLA B*08 (43% versus 25%, $p = 0.0012$) e para o HLA DR*03 (43% versus 25%, $p = 0,0015$).⁵⁰ Não realizamos estudo de HLA no presente estudo, mas em análise prévia o alelo HLA mais prevalente em pacientes com CEP foi o HLA DR*13 e muitos dos pacientes estudados naquele estudo foram também incluídos no presente ensaio.⁵⁷

Todos os tipos de análise de frequência dos padrões (p-ANCA atípico ou a avaliação conjunta de todos os padrões por imunofluorescência indireta) foram unânimes em apontar o grupo CEP/DII+ como diferente do grupo CEP/DII– e esse grupo como similar em reatividade ao grupo CBP. Mesmo tipo de conclusão também foi observado em relação à análise do PR3-ANCA. Embora poucos estudos sobre o assunto tenham sido desenvolvidos nessa área com resultados controversos, a possibilidade real de se estabelecer distinção sorológica entre CEP com e sem doença inflamatória intestinal e realçar as semelhanças e diferenças entre os subtipos de HAI são estímulos para se realizar estudos para maior esclarecimento desse conflituoso resultado.

Um conceito diferente de anticorpos antiantígenos leucocitários é o de excluir os soros com reatividade para antígenos específicos, principalmente contra a PR3 e MPO. Baseado nesse princípio, Wiik A introduziu o conceito de anticorpo específico para neutrófilo (NSA), deixando a terminologia ANCA apenas para os soros com reatividade específica definida para PR3 e MPO. Os

antígenos alvos sugeridos para o NSA na doença inflamatória intestinal (colite ulcerativa), CEP, HAI-1 e artrite reumatoide estariam relacionados a catepsina G, proteína que aumenta a permeabilidade bacteriana (BPI), lisozima, elastase, lactoferrina, catalase, α -enolase, actina, histona H1, grupo de proteínas de alta mobilidade (grupo 1 e grupo 2). Considerando que doenças autoimunes têm reatividade contra diferentes tipos de autoantígenos, esse conceito torna-se vago. Por exemplo, para a HAI-1 que apresenta alta reatividade contra actina-F, a reatividade contra componentes citoplasmáticos de neutrófilos é observação óbvia, e por essa razão não é de estranhar que a actina F tenha sido considerada em tempos atrás como antígeno alvo do p-ANCA atípico.^{59,60} Além do mais, ao rever as citações de Wiik⁵⁹ verifica-se que ele próprio não segue à risca o conceito que ele mesmo introduziu, pois arbitrariamente ele menciona dados de frequência de NSA que outros autores publicaram como p-ANCA atípico, sem que tenham sido pesquisadas reatividades contra antígenos específicos, anti-PR3 e anti-MPO, como é o caso da publicação de Seibold et al.⁴⁵ e Bossuyt⁶¹. Ao se realizar a análise estatística aplicando o conceito de NSA, perdeu-se a diferença significativa entre os grupos que havia sido observada anteriormente. Pelo fato de ser um conceito usado pouco frequentemente, por raros pesquisadores, pela falta de estudos utilizando conceitos semelhantes, pelo fato de certamente haver associação de anticorpos contra as especificidades antigênicas do NSA e do ANCA, acreditamos que esses resultados sejam irrelevantes e essa nomenclatura não deva ser utilizada correntemente, a não ser que haja padronização em consensos dessa terminologia.

Ao ser analisada a reatividade do ANCA por IFI e os resultados dos ELISAs anti-PR3 e anti-MPO, verifica-se que, para as doenças avaliadas no corrente estudo, fica inviável o conceito de c-ANCA e p-ANCA clássicos em virtude da presença e ausência de reatividade para a PR3 e MPO em soros negativos e positivos para o c-ANCA e p-ANCA clássicos respectivamente, com o que pode ser comprovado pela falta de evidência de concordância central pelo teste kappa e evidência de discordância marginal pelo teste de McNemar ao se comparar a reatividade do c-ANCA e anti-PR3. Nenhum dos oito soros positivos para o anti-MPO foi positivo para o p-ANCA clássico, como também nenhum dos quatro soros positivos para o p-ANCA clássico foi positivo para anti-MPO. Por outro lado, dos 25 soros positivos para o anti-PR3 apenas um mostrou concordância na reatividade para o c-ANCA clássico, enquanto dos três positivos para o c-ANCA clássico, apenas um foi positivo para o anti-PR3. A melhor associação ocorreu entre a não reatividade para os dois ELISAs (anti-PR3 e anti-MPO) e a determinação do padrão p-ANCA atípico, uma vez que dos 62 soros positivos para o p-ANCA atípico, 49 não apresentaram reatividade para os dois ELISAs e a minoria de 13 tiveram reatividade para um deles. Dessa forma poderia ser afirmado que não deve ser esperada qualquer relação entre a reatividade do ANCA observada por IFI com a reatividade dos ELISAs disponíveis comercialmente.

A pesquisa do ANA nesse estudo cumpriu o protocolo da pesquisa dos padrões do ANCA, pois sabidamente a reatividade nuclear pode interferir na leitura do ANCA.³⁸ Por esse motivo foi realizada a pesquisa a partir de 1/40 em células HEP2, quando normalmente a triagem se inicia em 1/80 e não foi realizado nenhum estudo estatístico, pois certamente os resultados estão

superestimados, justificando resultado relativamente alto no grupo controle. Todavia vale ressaltar a reatividade semelhante do ANA nos portadores de CEP/DII+ e CEP/DII-, com o padrão pontilhado fino sendo o mais prevalente. Entre os grupos de HAI, mais uma semelhança entre as HAI-1 e HAI-3, com reatividade similar e novamente o padrão pontilhado fino foi o mais comumente encontrado. Em relação ao tipo HAI-3, esse padrão pode ser explicado pela presença esperada do anticorpo anti-SSA/Ro que está presente concomitantemente em 70-90% dos pacientes com reatividade para o anti-SLA/LP.^{62,63} Quanto a HAI-2, a reatividade para o ANA é sabidamente menor. Os resultados mais surpreendentes foram observados na CBP, pois foi observada frequência muito elevada do padrão centromérico (geralmente encontrado na proporção de 10-20%) e baixa do padrão envelope nuclear, mais frequentemente relacionado à proteína gp210, e do padrão pontos nucleares isolados, mais frequentemente relacionado à proteína sp100 (encontrados nas frequências aproximadas de 20-30%).⁶³ A explicação para tal fato se deve provavelmente à amostra selecionada, pois na coorte de cerca de 300 pacientes com CBP do ambulatório de colestase do Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, os resultados encontrados são semelhantes ao da literatura.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

7.1. Do ponto de vista de reatividade do p-ANCA atípico e do anti-PR3, a colangite esclerosante primária com doença inflamatória intestinal tem comportamento diferente da colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal.

7.2. Quanto a reatividade dos diversos tipos de ANCAs e anti-PR3, colangite esclerosante primária sem doença inflamatória intestinal teve comportamento semelhante ao da colangite biliar primária, o que pode sugerir que a maior frequência do p-ANCA atípico e anti-PR3 esteja mais associada à doença inflamatória intestinal do que à colangite esclerosante primária.

7.3. Do ponto de vista de reatividade do p-ANCA atípico, pacientes com HAI-1 e HAI-3 comportam-se de forma semelhante entre si e diferentemente dos pacientes com HAI-2.

7.4. Não houve concordância entre os resultados da imunofluorescência indireta para os padrões c-ANCA e p-ANCA clássicos e os do ELISA anti-PR3 e anti-MPO.

7.5. A melhor concordância de leitura dos padrões do ANCA ficou para o p-ANCA atípico, porque a maioria dos soros com esse padrão não teve reatividade nem para o anti-PR3 nem para o anti-MPO por ELISA.

7.6. Para doenças do aparelho digestivo (doença inflamatória intestinal, colangite esclerosante primária e hepatite autoimune) é difícil interpretar os padrões de imunofluorescência do ANCA diante da reatividade observada nos ELISAs comerciais.

Referências

Bibliográficas

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Krones E, Graziadei I, Trauner M, Fickert P. Evolving concepts in primary sclerosing cholangitis. *Liver Int.* 2012. 32:352-69.
2. Karlsen TH, Schrumpf E, Boberg K. Primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010. 24:655-66.
3. Cullen S & Chapman R. Review article: current management of primary sclerosing cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;21:933-48.
4. Karlsen TH, Schrumpf E, Boberg K. A Lecture on the Genetics of Primary Sclerosing Cholangitis. *Dig Liver Dis.* 2010;42:390-400.
5. Wiencke K & Boberg K. Current consensus on the management of primary sclerosing cholangitis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011;35:786-91.
6. Lee YM & Kaplan M. Management of primary sclerosing cholangitis. Practice Guideline Committee of the ACG. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:528-34.
7. Reunião de Diretrizes de Doenças Colestáticas e Hepatite Autoimune da Sociedade brasileira de Hepatite. 2014; 36. Disponível em: www.sbhepatologia.org.br/pdf/reuniao-de-diretrizes.docx
8. Lindor KD, Kowdley KV, Harrison ME. ACG Clinical Guideline: Primary Sclerosing Cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2015; 110:646–659.
9. Trauner M, Halilbasic E, Baghdasaryan A, Moustafa T, Krones E, Fickert P, Hofer H, Penner E. Primary Sclerosing Cholangitis: New Approaches to Diagnosis, Surveillance and Treatment. *Dig Dis.* 2012; 1:39-47.
10. Navaneethan UGK, Venkatesh P, Lashner B, Lopez R, Kiran R, Shen B. Severity of primary sclerosing cholangitis and its impact on the clinical outcome of Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2012;6:674-80.

11. Marelli L, Xirouchakis E, Kalambokis G, Cholongitas E, Hamilton M, Burroughs AK. Does the severity of primary sclerosing cholangitis influence the clinical course of associated ulcerative colitis?. *Gut*. 2011;60:1224-8.
12. Sano H, Nakazawa T, Ando T. Clinical characteristics of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2011;18:154-61.
13. Moayyeri, A, Daryani, NE; Bahrami H. Clinical course of ulcerative colitis in patients with and without primary sclerosing cholangitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20:366e70.
14. Miao XP, Sun XN, Wei H, Ouyang Q. Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis: a case report and review of the literature. *Intern Med*. 2011;51:2077-81.
15. Atkinson AJ, Carroll WW. Sclerosing cholangitis association with regional enteritis. *JAMA*. 1964; 188: 183-184.
16. Harrison PM. Diagnosis of primary sclerosing cholangitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 1999;6:356-60.
17. Faber V & Elling P. Leukocyte-specific antinuclear factors in patients with Felty's syndrome, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematoses and other diseases. *Acta Med Scand*. 1966; 179:257–267.
18. Nakamura R, Matsutani M, Barry M. Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. *Clin Chim acta*. 2003. 9:20 apud Faber V, Elling P. 1966.
19. Tervaert JWC & Damoiseaux J. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies: How Are They Detected and What Is Their Use for Diagnosis, Classification and Follow-up?. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2012; 43:211–219.
20. Lesavre P, Noel LH, Gayno S; Nusbaum, P, Reumaux D, Erlinger S, Frunfeld JP, Halbwachs-Mecarelli L. Atypical autoantigen targets of perinuclear antineutrophil cytoplasm antibodies (p-ANCA): specificity and clinical association. *J Autoimmunity*. 1993;6:185-95.

21. Radice A, Sabadini E, Sinico RA. Autoantibodies. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for proteinase 3. Italia: Elsevier; 2007;105-110.
22. Kallenberg CGM. Autoantibodies. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase. Italia: Elsevier; 2007;95-103.
23. Wiik A. Autoantibodies. Neutrophil-specific antinuclear and anti-cytoplasmic antibodies in chronic inflammatory diseases. Italia: Elsevier; 2007;111-117.
24. Terjung B, Sohne JS, Lechtenberg B, Gottwein J, Muennich M, Herzog V, Mahler M, Sauerburch T, Spengler U. p-ANCAs in autoimmune liver disorders recognize human β -tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. Gut. 2010;59:808-816.
25. Haagsma EB, Mulder AHL, Gouw ASH, Horst G, Meerman L, Slooff MJH, Kallenberg CGM. Neutrophil cytoplasmic autoantibodies after liver transplantation in patients with primary sclerosing cholangitis. J Hepatol. 1993;19:8-14.
26. Bansal DS, Fleming KA, Capman RW. Importance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: prevalence, titre, and IgG subclass. Gut. 1996;38:384-9.
27. Terjung B, Worman HJ, Herzog V, Sauerbruch T, Spengler U. Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) using immunofluorescence microscopy. Clin Exp Immunol. 2001;126:37-46.
28. Rasmussen N, Wiik A, Jayne DR. A historical essay on detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Nephrol Dial Transplant. 2015; 30:8-13.
29. Mahler M, Bogdanos DP, Pavlidis P, Fritzler MJ, Csernok E, Damoiseaux J, Bentow C, Shum Z, Forbes A, Norman GL. PR3-ANCA: A promising biomarker for ulcerative colitis with extensive disease. Clinica Chimica Acta. 2013; 424: 267–273.
30. Alvarez E, Berg IA, Bianchi EB, Bianchi L, Burroughs AK. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J Hepatol. 1999; 31: 929-938.

31. Manns MP, Vogel A. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology*. 2006;43:5132-44.
32. Roozendaal C, de Jong MA, van den Berg AP, van Wikk RT, Limburg PC, Kallenberg CGM. Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *J Hepatol*. 2000;32:734-41.
33. Teufel A, Weinmann A, Kahaly GJ, Centner C, Piendl A, Worns M, Lohse AW, Galle PR, Kanzler S. Concurrent autoimmune disease In patients with autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2010;44:208-13.
34. Bogdanos DP & Komorowski L. Disease-specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta*. 2011;41:502-12.
35. Hirschfield GM & Gershwin ME Primary biliary cirrhosis: one disease with many faces. *Isr Med Assoc J*. 2011;13:55-9.
36. Frenzer A, Fierz W, Rundler E, Hammer B, Binek J. Inflammatory Bowel disease. Atypical, cytoplasmic and perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1998. 13: 850-954.
37. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage CO, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol*. 1999;111(4):507-13.
38. Cançado ELR, Abrantes-Lemos CP, Terrabuio DRB. The importance of autoantibody detection in autoimmune hepatitis. *Frontiers in Immunology*. 2015, 6: 1-5.
39. Chan, EKL, Damoiseaux J, Carballo G, Conrad K, de Melo CW, Francescantonio PLC, Fritzler MJ, Garcia-De La TI, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Mühlen CA, Andrade LEC. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns (ICAP). *Frontiers in Immunology*. 2014-2015. 6:215.

40. Fisher RA. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1922;87-94.
41. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of statistics*. 1979; 65-70.
42. McNemar, Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika*. 1947; 12(2), 153-157.
43. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
44. Zauli D, Ghetti S, Grassi A, Descovich C, Cassani F, Ballardini G, Muratori L, Bianchi FB. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 1997. 25,5:1105-1107.
45. Seibold F, Weber P, Klein R, Berg PA, Wiedmann KH. Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing. *Gut*. 1992. 33: 657-662.
46. Claise C, Johanet C, Bouhnik Y, Kapel N, Homberg J-C, Poupon R. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in autoimmune liver and inflammatory bowel diseases. *Liver*. 1996. 16:28-34.
46. Roozendaal C & Kallenberg CGM. Are anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) clinically useful in inflammatory bowel disease (IBD)?. *Clin Exp Immunol*. 1999. 116:206-213.
48. Duerr RH, Targan SRT, Landers CJ, Larusso NF, Lindsay KL, Wiesner RH, Shanahan F. Neutrophil cytoplasmic antibodies: A link between primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1991. 100 (5):1385 – 1391.
49. Hardarsson S, Labrecque DR, Mitros FA, Neil G A, Goeken JA. Antineutrophil cytoplasmic antibody in inflammatory bowel and hepatobiliary diseases. High prevalence in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis. *Clinical microbiology and immunology*. 1993. 277-281.

50. Lenzen H, Weismuller TJ, Negm AA, Wlecke J, Loges S, Strassburg CP, Manns MP, Lankisch TO. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in bile are associated with disease activity in primary sclerosing cholangitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2013. 48:1205-1212.
51. Hov JR, Boberg KM, Taraldsrud E, Vesterhus M, Boyadzhieva M, Solberg IC, Schrumpf E, Vatn MH, Lie BA, Molberg O, Karlsen TH. Antineurophil antibodies define clinical and genetic subgroups in primary sclerosing cholangitis. *Liver International*. 2016: 1-8.
52. Targan SR, Landers C, Vidrich A, Czaja AJ. High-titer antineutrophil cytoplasmic antibodies in type-1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1995 108:1159-1166.
53. Zauli D, Ghetti S, Grassi A, Descovich C, Cassani F, Ballardini G, Muratori L, Bianchi FB. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 1997. 25 (5): 1105- - 1107.
54. Jolles S, Deacock S, Turnbull W Silvestrini R, Bunn, C, White P, Ward M. Atypical c-ANCA following high dose intravenous immunoglobulin. *J Clin Pathol*. 1999. 52:177-180.
55. Trevisin M, Pollock W, Dimech W, Melny J, Paspaliaris B, Gillis D Wong R, Savage J. 2008. *Am J Clin Pathol*. 129 (1):42-53.
56. Stinton LM, Bentow C, Mahler M, Norman GL, Eksteen B, Mason AL, Kaplan GG, Lindkvist B, Hirschfield GM, Milkiewicz P, Cheung A, Janssen HLA, Marvin JF. PR3-ANCA: a promising biomarker in primary sclerosing cholangitis (PSC). *Plos One*. 2014. 9 (11):1-8.
57. Bittencourt PL, Palacios SA, Cançado EL, Carrilho FJ, Porta G, Kalil J, Goldberg AC. Susceptibility to primary sclerosing cholangitis in Brazil is associated with HLA-DRB1*13 but not with tumour necrosis factor alpha -308 promoter polymorphism. *Gut*. 2002. 51:609-10.
58. Cançado EL, Abrantes-Lemos CP, Vilas-Boas LS, Novo NF, Carrilho FJ, Laudanna AA. Thermolabile and calcium-dependent serum factor interferes with

polymerized actin, and impairs anti-actin antibody detection. *J Autoimmun.* 2001;17::223-8.

59. Orth T, Gerken G, Kellner R, Meyer zumBüschenfelde KH, Mayet WJ. Actin is a target antigen of anti-neutrophil cytoplasmicantibodies (ANCA) in autoimmune hepatitis type-1. *J Hepatol.* 1997. 26:37-47.

60. Wiik A. Neutrophil-specific autoantibodies in chronic inflammatory bowel diseases. *Autoimmunity reviews.* 2002. 1: 67-72.

61. Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clinical Chemistry.* 2006. 52 (2): 171-181.

62. Eyraud V, Chazouilleres O, Ballot E, Corpechot C, Poupon R, Johanet C. Significance of antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas: a large French study. *Liver Int.* 2009. 29:857-64.

63. Montano-Loza AJ, Shums Z, Norman GL, Czaja AJ. Prognostic implications of antibodies to Ro/SSA and soluble liver antigen in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int.* 2012. 32:85-92.

64. Nakamura M. Clinical significance of autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 2014.34:334–40.